

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Comparação de métodos para estudo da transmissão de oxigénio através de diferentes vedantes de vinho

Tese de Mestrado

de

Miguel José de Carvalho China Pereira

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Amorim e Irmãos, S. A. - Investigação e Desenvolvimento



Orientadora na FEUP: Prof. Margarida Bastos

Orientador na Amorim e Irmãos, S.A.: Prof. Doutor Miguel Cabral

Departamento de Engenharia Química

Julho de 2013

Agradecimentos

O trabalho desenvolvido não seria possível sem que um conjunto de pessoas se envolvesse e dedicasse para a sua elaboração. Não se deve nem se pode ignorar todas as pessoas que me ajudaram e apoiaram ao longo de todo o projeto.

Queria agradecer em primeiro lugar à empresa Amorim & Irmãos, S. A. pela porta que me abriu, o que me permitiu crescer profissional e pessoalmente e pelo financiamento disponibilizado. Dentro deste grupo existem muitas pessoas que se envolveram e a quem gostaria de deixar uma palavra de apreço. O meu primeiro agradecimento dirige-se ao Professor Doutor Miguel Cabral pelas condições de trabalho proporcionadas, conselhos dados e experiência transmitida. Gostaria também de agradecer ao Doutor Paulo Lopes por todos os conhecimentos transmitidos, pelo apoio prestado na resolução dos problemas, por todo tempo disponibilizado para o desenvolvimento deste projeto, pela paciência e pela dedicação pois sem isso o trabalho teria sido mais dificilmente concretizado. À Dr^a Isabel Roseira, queria agradecer pela simpatia demonstrada. Aos colegas de trabalho do departamento do I&D Ana Malheiro, Carlos Costa, Eliana Reis, Filomena Fonseca, Hugo Amorim, Patrícia Oliveira e Salomé Reis quero agradecer por todo o apoio laboratorial prestado, bem como pela amizade, boa disposição e pelo excelente acolhimento que me proporcionaram. A todos os colaboradores do LabCork gostaria de dirigir o meu agradecimento pelo companheirismo. E por último, no grupo Amorim, quero agradecer ao corpo integrante do laboratório de Amorim Distribuição pela disponibilidade sempre demonstrada em ajudar ao longo do projeto.

Em segundo lugar quero agradecer à professora Margarida Bastos por toda a paciência, dedicação e preocupação no trabalho desenvolvido e a todos os professores do Departamento de Engenharia Química da FEUP a quem devo muito do conhecimento adquirido ao longo dos 5 anos de curso.

Em terceiro lugar, mas não menos importante, queria dirigir um grande obrigado à minha Mãe e ao meu Pai que sempre me apoiaram, ajudaram e incentivaram a continuar e a lutar por um futuro melhor e a quem devo tudo o que sou hoje.

Por último, e como nem só de trabalho vive o homem, queria agradecer a todos aqueles que fora das horas de trabalho na empresa, me ajudaram a superar esta etapa. Um muito obrigado ao meu irmão Rui, à Paula e à minha namorada pela paciência, boa disposição e alegria que me proporcionaram depois dos dias de trabalho, aliviando assim o cansaço sentido, e também aos meus amigos, de Vila Real e do Porto, pelo companheirismo e alegria que sempre me transmitiram porque sem eles tudo era mais difícil.

Resumo

Este projeto tem como principais objetivos a comparação de métodos para o estudo da transmissão de oxigénio ao vinho em função de diferentes tipos de vedantes e a aplicação de um dos métodos no estudo da entrada de oxigénio na garrafa aquando do engarrafamento.

Os métodos escolhidos para avaliarem a quantidade de oxigénio ao longo do tempo foram a colorimetria e a quimiluminescência, dois dos métodos mais recentes e mais utilizados para este fim. Estes foram aplicadas em três ensaios diferentes: um ensaio usando o método da colorimetria e dois ensaios usando o método da quimiluminescência, um em garrafas vazias e outro em garrafas com solução ácida. Estes três métodos foram estudados para analisar a transmissão de oxigénio através de três vedantes: rolha de cortiça natural, rolha técnica (Neutrocork®) e rolha sintética (Nomacorc®).

Observou-se que o ensaio do estudo de transmissão de oxigénio avaliado pelo método da colorimetria e o mesmo ensaio avaliado pelo método de quimiluminescência em garrafas vazias apresentaram resultados estatisticamente idênticos após o quinto dia de análise. A maior diferença existente entre estes dois métodos encontrava-se no facto de o método de colorimetria incluir a entrada de oxigénio no momento de engarrafamento. Com o acompanhamento da evolução da quantidade de oxigénio presente no interior das garrafas foi possível a criação de modelos matemáticos capazes de descreverem a entrada de oxigénio através dos vedantes e reconhecer a proximidade dos resultados apresentados por estes dois métodos.

Com o estudo do caso real apresentado, comprovou-se a utilidade que o método da quimiluminescência pode ter nesta temática.

Palavras-chave: colorimetria, quimiluminescência, transmissão de oxigénio, cortiça natural, Nomacorc®, Neutrocork®.

Abstract

The main objective of this project is the comparison of different methods of study of the transmission of oxygen to wine for different types of seals and application of a method to study the flow of oxygen in the bottle when bottling.

The methods chosen to evaluate the amount of oxygen over time were colorimetric and a technique using optical-chemical sensor. These two methods are the most recent and more widely used for this purpose and these methods were applied in three different tests: one for colorimetric method and two tests using optical-chemical sensor technology in empty bottles and bottles with acid solution. These three methods have been studied for analyzing the oxygen transmission through three seals: natural cork stoppers, technical stoppers (Neutrocork®) and synthetic cork (Nomacorc®).

It was observed that the colorimetric method and test using the empty bottles are statistically identical after the 5th day of analysis. The major difference between these two tests is the fact that the colorimetric method includes the oxygen input at the time of bottling. By monitoring the evolution of the amount of oxygen present in the bottles, it was possible to create mathematical models able to describe the flow of oxygen through the seals and recognize the closeness of the results provided by these two technologies.

With real case study presented, proved the usefulness of the luminescence-based technique may have on this topic.

Keywords: colorimetric, luminescence-based technique, oxygen transmission, natural cork, Nomacorc®, Neutrocork®.

Declaração

Declaro, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Segunda-feira, 08 de Julho de 2013

(Miguel José de Carvalho China Pereira)

Índice

1	Introdução	1
1.1	Apresentação da empresa	1
1.2	A cortiça.....	1
1.3	Vedantes	3
1.4	Relação oxigénio, vedante e vinho	5
1.5	Enquadramento e Apresentação do Projeto	6
1.6	Contributos do Trabalho	7
1.7	Organização da Tese	7
2	Contexto e Estado de Arte	9
3	Descrição Técnica.....	13
3.1	Comparação de métodos de estudo de transmissão de oxigénio.....	13
3.1.1	Materiais.....	13
3.1.1.1	Vedantes em estudo	13
3.1.1.2	Garrafas.....	14
3.1.2	Métodos	14
3.1.2.1	Método colorimétrico	14
3.1.2.2	Calibração do método da colorimetria	15
3.1.2.3	Ensaio de engarrafamento / conservação - método colorimétrico.....	16
3.1.2.4	Método de Quimiluminescência.....	17
3.1.2.5	Calibração do equipamento de quimiluminescência	18
3.1.2.6	Ensaio de engarrafamento / conservação - método de quimiluminescência	19
3.1.3	Medições periódicas	20
3.1.4	Estudo de pressão	21
3.1.5	Tratamento estatístico.....	21
3.2	Aplicação do método de quimiluminescência a um ensaio de engarrafamento / conservação de vinho	21
3.2.1	Garrafas.....	22
3.2.2	Rolhas	22

3.2.3	Ensaio de engarrafamento / conservação do caso real	22
3.2.4	Análises químicas e físico-mecânicas.....	23
4	Discussão dos resultados.....	24
4.1	Dimensões dos vedantes em estudo.....	24
4.2	Transmissão de oxigénio de diferentes vedantes de vinhos medido por diferentes métodos.....	24
4.2.1	Medição da transmissão de oxigénio pelo do método de colorimetria	24
4.2.2	Medição da transmissão de oxigénio pelo método de quimiluminescência	26
4.2.2.1	Ensaio em garrafas vazias.....	26
4.2.2.2	Ensaio em garrafas com solução ácida	27
4.2.3	Comparação dos ensaios para cada tipo de vedante	29
4.2.4	Modelos Matemáticos.....	32
4.3	Aplicação da técnica de quimiluminescência a um ensaio de engarrafamento de vinho 36	
4.3.1	Evolução do oxigénio no vinho.....	36
4.3.2	Análises químicas ao vinho	38
4.3.3	Análises físico-mecânicos - ensaios de forças de extração e absorção das rolhas.....	40
5	Conclusões	42
6	Avaliação do Trabalho Realizado	43
6.1	Objetivos Realizados	43
6.2	Outros Trabalhos.....	43
6.3	Limitações e Trabalho Futuro.....	44
7	Referências	45
Anexo 1	Caraterísticas e propriedades dos sensores PSt6	48
Anexo 2	Dados para a calibração do equipamento do método da quimiluminescência	50

Índice de Figuras

<i>Figura 1 - Rolhas comercializadas pela A&I</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2 - Alguns vedantes alternativos às rolhas de cortiça.</i>	<i>4</i>
<i>Figura 3 - Esquema de sensações que o vinho pode ter em função do processo de oxidação/redução</i>	<i>5</i>
<i>Figura 4 - Amostras em estudo: (1) rolhas de cortiça natural, (2) rolhas Neutrocork®, (3) rolhas Nomatic®</i>	<i>13</i>
<i>Figura 5 - Reação de redução do carmim de índigo pelo ditonato de sódio (A) e oxidação do carmim de índigo através de oxigénio (B)</i>	<i>14</i>
<i>Figura 6 - Colorímetro.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 7 - Procedimento de redução do carmim de índigo</i>	<i>15</i>
<i>Figura 8 - Procedimento de oxidação do carmim de índigo</i>	<i>16</i>
<i>Figura 9 - Princípio da dinâmica de luminescência.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 10 - Esquema representativo da medição da concentração de oxigénio através do método da quimiluminescência (A) e do equipamento usado: (B) Equipamento, (C) Fibra ótica, (D) Sensor de temperatura.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 11 - Garrafa usada nos ensaios realizados com garrafa vazia.</i>	<i>19</i>
<i>Figura 12 - Garrafa usada no ensaio realizado com solução ácida.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 13 - Curva de calibração para o método da colorimetria.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 14 - Cinética de transmissão de oxigénio ao longo do tempo de conservação para o método da colorimetria ao longo do tempo de conservação.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 15 - Cinéticas de transmissão de oxigénio através de diferentes vedantes medidos por quimiluminescência para as garrafas vazias ao longo do tempo de conservação.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 16 - Cinéticas de transmissão de oxigénio através de diferentes vedantes medidos por quimiluminescência para as garrafas com solução ácida ao longo do tempo de conservação.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 17 - Exemplo de uma garrafa que apresenta estruturas alegadamente microbianas... ..</i>	<i>28</i>
<i>Figura 18 - Comparação do ensaio de colorimetria e de quimiluminescência (garrafas vazias) para a avaliação de transmissão de oxigénio em rolhas de cortiça natural.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 19 - Comparação do ensaio de colorimetria e de quimiluminescência (garrafas vazias) para a avaliação de transmissão de oxigénio para as rolhas Neutrocork®.</i>	<i>30</i>

<i>Figura 20 - Comparação do ensaio de colorimetria e de quimiluminescência (garrafas vazias) para a avaliação de transmissão de oxigénio para as rolhas Nomatic®.</i>	31
<i>Figura 21 - Modelos matemáticos preditivos das cinéticas de transmissão de oxigénio do ensaio de colorimetria e de quimiluminescência (garrafas vazias) para rolhas de cortiça natural.</i>	34
<i>Figura 22 - Modelos matemáticos preditivos das cinéticas de transmissão de oxigénio do ensaio de colorimetria e de quimiluminescência (garrafas vazias) para rolhas Neutrocork®.</i>	35
<i>Figura 23 - Modelos matemáticos preditivos das cinéticas de transmissão de oxigénio do ensaio de colorimetria e de quimiluminescência (garrafas vazias) para as rolhas Nomatic®.</i>	35
<i>Figura 24 - Evolução da concentração de oxigénio dissolvido e no headspace no vinho branco HMR durante 70 dias de conservação.</i>	37
<i>Figura 25 - Valores percentuais médios de oxigénio no headspace (OHS) e dissolvido (OD) no vinho branco HMR durante 70 dias de conservação.</i>	38
<i>Figura 26 - Evolução da concentração do SO₂ livre de um vinho branco HMR após um mês do engarrafamento usando diferentes revestimentos.</i>	39
<i>Figura 27 - Evolução da concentração do SO₂ total de um vinho branco HMR após um mês do engarrafamento usando diferentes revestimentos.</i>	39
<i>Figura 28 - Evolução da cor (Abs 420 nm) de um vinho branco HMR após um mês do engarrafamento usando diferentes revestimentos.</i>	40
<i>Figura 29 - Forças de extração das rolhas de cortiça natural com diferentes revestimentos após um mês do engarrafamento.</i>	40
<i>Figura 30 - Percentagem de absorção das rolhas após um mês do engarrafamento.</i>	41

Índice de tabelas

<i>Tabela 1 - Composição química média da cortiça virgem e da cortiça amadia de 10 árvores da região de Mora.....</i>	<i>2</i>
<i>Tabela 2 - Comparação de taxa de transmissão de oxigénio (TTO) após o primeiro mês entre dois estudos desenvolvidos.....</i>	<i>6</i>
<i>Tabela 3 - Gama de medição e limites de deteção dos sensores PSt6.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 4 - Amostra usadas no engarrafamento do vinho HRM na Vidigueira.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabela 5 - Média das dimensões e propriedades dos vedantes usados</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 6 - Valores médias de taxas de transmissão de oxigénio para os diferentes ensaios segundo diferentes intervalos de tempo.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 7 - Composição química do vinho utilizado no ensaio de engarrafamento</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 8 - Especificações do sensor PSt6</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 9 - Propriedades do sensor PSt6.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 10 - Dados para a calibração do equipamento de quimiluminescência para os sensores PSt6 usados</i>	<i>50</i>

Notação e Glossário

TTO	Taxa de transmissão de oxigénio	mL/dia
OD	Oxigénio dissolvido	mg ou mg/L
OHS	Oxigénio no headspace	mg ou mg/L
OT	Oxigénio total	mg ou mg/L

Lista de siglas

A&I	Amorim e Irmãos
AD	Amorim Distribuição
APCOR	Associação Portuguesa de Cortiça
ECD	Detetor de captura eletrónica
FEUP	Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
GC	Cromatografia gasosa
HMR	Herdade do Monte da Ribeira
H NMR	Ressonância Magnética Nuclear Protónica
I&D	Investigação e Desenvolvimento
L*	Luminosidade
MIEQ	Mestrado Integrado em Engenharia Química
S. A.	Sociedade Anónima
SPME	Microextração em fase sólida
TCA	2,4,6-Tricloroanisol

1 Introdução

1.1 Apresentação da empresa

Portugal assume a liderança no mercado internacional da cortiça, com 62 % de quota no mercado, sendo esta uma importante fonte de rendimento para o país. As rolhas de cortiça têm um peso de aproximadamente 70 % na produção nacional de cortiça, com um valor de 306 milhões de euros de volume de negócio em 2012 (Anuário APCOR, 2012).

A Corticeira Amorim SPGS, S.A. é a maior empresa de cortiça do mundo e está presente em mais de 100 países, com 70 empresas, 30 unidades produtivas e 227 agentes, e o seu mercado está espalhado por todos os continentes. Com 140 anos de história, esta empresa é a prova do trabalho, dedicação, determinação e audácia de várias gerações que ajudaram e revolucionaram o mundo da cortiça em Portugal e no Mundo. A corticeira é responsável pela produção de diversos produtos, tendo unidades de negócio nas matérias-primas, revestimentos, isolamentos, aglomerados compósitos e nas conhecidas rolhas de cortiça. Em 2012, as vendas a Corticeira Amorim ultrapassaram pela primeira vez os 500 milhões de euros. O resultado líquido cresceu 22,9 % para 31 milhões de euros e os Estados Unidos da América tornaram-se o principal destino de exportações (Relatório de Contas, 2012).

A Amorim & Irmãos, S.A. (A&I) é uma das empresas do universo da Corticeira Amorim SPGS, responsável pelo negócio de rolhas com uma quota global de mercado equivalente a 32%. Sendo a maior produtora e fornecedora de rolhas de cortiça a nível mundial, criou empresas em países Europeus e expandiu-se para os mercados da América do Norte e do Sul, África, Austrália, etc. evidenciando um crescimento contínuo e consistente ano após ano. As unidades produtivas das rolhas de cortiça situam-se em Portugal continental, sendo a A&I responsável pela produção de 3,5 mil milhões de rolhas anualmente. De toda esta produção, grande parte destina-se ao mercado internacional, efetuando-se vendas para mais de 82 países, 15 000 clientes ativos e 17 *sales companies* no exterior.

1.2 A cortiça

Portugal é responsável por uma produção anual de 100 000 toneladas de cortiça (49.6% da produção mundial). A cortiça é a casca do sobreiro (*Quercus suber L.*), árvore geograficamente presente nas zonas mediterrânicas (Península Ibérica, Sul de França, Itália e Norte de África). Em Portugal existem 715 922 ha² de sobreiro, estando situada no Alentejo 84 % desta área. A cortiça é extraída dos sobreiros de 9 em 9 anos; contudo, a sua exploração

económica só é interessante a partir do momento em que se pode produzir rolhas de cortiça, o que ocorre por volta dos 40 anos após a realização do terceiro descortiçamento (Anuário APCOR, 2012).

Os sobreiros estão integrados em sistemas de agrosilvopastoris, designados por montados, que são muitas das vezes a base económica da região onde estão inseridos. No mundo da cortiça, as pranchas retiradas do sobreiro são classificadas atendendo ao calibre que têm, ou seja, são classificadas consoante espessura, qualidade e homogeneidade. Como qualquer outro produto, a classificação a que as pranchas de cortiça estão sujeitas, está relacionada com o produto final a que se destina. Esta classificação está inteiramente ligada com a produção de rolhas de cortiça e que tem, como base, características fundamentais, tais como a porosidade (Karbowski et al, 2010).

A composição química da cortiça (Tabela 1) faz com que as suas propriedades sejam únicas e difíceis de igualar por qualquer outro produto artificial. A suberina é polímero estrutural e maioritário da cortiça sendo formada por uma mistura de ácidos orgânicos, que lhe confere a capacidade de impedir a passagem de água pois é insolúvel na água, álcool, éter, entre outros compostos. Para além de impermeável, a cortiça é agrupada numa estrutura alveolar característica; contem células desde 10 até aos 50 micrómetros e todas estas células estão preenchidas por uma mistura de gases o que confere à cortiça uma grande leveza, isto é uma densidade bastante baixa. Este tipo de estrutura confere à cortiça a elasticidade e compressibilidade que lhe permite a sua utilização em diferentes tipos de aplicações (Fortes et al., 2004).

Tabela 1 - Composição química média da cortiça virgem e da cortiça amadia de 10 árvores da região de Mora (Fortes et al., 2004)

Componente	% Peso seco ¹	
	Cortiça virgem	Cortiça amadia
Suberina	0,9 (0,2)	1,2 (0,2)
Lenhina	16,9 (2,5)	14,2 (1,1)
Polissacarídeos	35,2 (3,1)	39,4 (1,7)
Extrativos	22,4 (1,1)	24,0 (0,8)
Cinza	21,3 (2,4)	19,9 (2,6)

¹Os valores apresentados entre parênteses representam o desvio-padrão.

1.3 Vedantes

A unidade do negócio de rolhas de cortiça da A&I tem como produtos as rolhas naturais, colmatadas, de champanhe (Spark®), técnicas (Neutrocork® e Twin Top®), aglomeradas e capsuladas. Cada tipo de rolha pode ter várias dimensões mediante a procura do cliente final. As rolhas naturais são aquelas que não sofrem qualquer tipo de transformação nem modificação. São obtidas por brocagem a partir das pranchas de cortiça retiradas dos sobreiros (Rolhas naturais, 2013). As rolhas de colmatadas são rolhas de cortiça natural em que os seus poros são preenchidos por pó de cortiça e cola. Apresentam uma aspeto visual homogéneo, o que melhora a aparência para os clientes e melhora também a performance da mesma (Rolhas naturais colmatadas, 2013). As rolhas de champanhe, como próprio nome indica, são rolhas especialmente produzidas para servir de vedante a vinhos gaseificados, champanhe, espumantes e sidra e são de maiores dimensões que as rolhas normais pois têm que suportar elevadas pressões proporcionadas pelo vinho que estão a armazenar (Rolhas de champanhe, 2013). Outra das rolhas produzidas pela A&I são as rolhas técnicas. Este tipo de rolha é normalmente destinado a vinhos para serem consumidos num curto espaço de tempo, 2 a 3 anos, e são constituídas por aglomerados de grânulos de cortiça (Rolhas técnicas, 2013). As rolhas aglomeradas foram criadas para engarrafar vinhos de baixo preço e de alta rotação e para serem consumidos em menos de 12 meses. São rolhas homogéneas, produzidas através de granulos de cortiça provenientes da rolha natural e são fabricadas por moldação individual ou por extrusão (Rolhas aglomeradas, 2013). Por último, as rolhas capsuladas são rolhas de cortiça natural ou técnica com uma capsula num dos topos que pode ser de diferentes materias (PVC, madeira, entre outros). Este vedante é geralmente usado em garrafas de consumo repartido. Normalmente esta rolha é aplicada em garrafas de Vinho do Porto, moscatel ou até em whisky, vodka entre outros (Rolhas capsuladas, 2013). Na Figura 1 apresenta-se alguns dos tipos de rolha comercializados pela A&I.

Durante todos estes anos, as rolhas de cortiça têm sido e continuam a ser preferencialmente usadas como vedantes em garrafas de vinho. Na década de 90, vedantes alternativos chegaram ao mercado, fruto dos problemas associados ao “gosto a mofo” que algumas rolhas de cortiça apresentavam. A rolha de cortiça tem uma grande importância para o desenvolvimento do vinho, permitindo que este tenha um envelhecimento lento o que faz com que alguns aromas específicos se desenvolvam e se mantenham. Podem haver, contudo, alguns compostos na rolha de cortiça que podem adulterar a qualidade do vinho, como por exemplo o 2,4,6-tricloroanisol (TCA), responsável por aromas a mofo e bafio, sendo o principal problema que este tipo de vedante pode apresentar. A origem deste composto ainda é desconhecida estando vários estudos acerca desta temática a serem desenvolvidos de forma a encontrar a verdadeira origem do problema (Poças *et al*, 2010).



Figura 1 - Rolhas comercializadas pela A&I (Catálogo Rolhas, 2013).

No mercado mundial apareceram vedantes alternativos que tentaram aproveitar a debilidade da rolha de cortiça para se poderem instalar no mercado. Uma variedade de vedantes sintéticos produzidos por processos de extrusão ou injeção a partir de diferentes polímeros sintéticos são hoje comercializados. Estes vedantes sintéticos apresentam geralmente alta permeabilidade ao oxigénio, como provado por alguns estudos e testes realizados (Lopes *et al*, 2005). Apesar de geralmente não terem contaminação por TCA, este tipo de vedantes pode ceder ao vinho, componentes e aditivos relacionados com o plástico. Outra das alternativas às rolhas de cortiça são as cápsulas de rosca, que se podem encontrar mais frequentemente nas garrafas de bebidas brancas mas também vedando garrafas de vinho tranquilo. Este tipo de vedantes representa um distinto sistema de vedação que é normalmente feito de alumínio. Tem um disco que representa uma proteção para a entrada de ar na garrafa, normalmente composto por um revestimento de poli(cloreto de vinilideno) (PVDC). (Poças *et al*, 2010). Na Figura 2 apresenta-se alguns dos vedantes alternativos às rolhas de cortiça.



Figura 2 - Alguns vedantes alternativos às rolhas de cortiça.

1.4 Relação oxigénio, vedante e vinho

O controlo do oxigénio que entra numa garrafa através de um vedante é uma das preocupações e desafios numa linha de engarrafamento. A preocupação com a oxigenação faz com que haja reajustamentos nos procedimentos para assegurar que o vinho venha a conseguir ter a qualidade pretendida pelo cliente. Um dos procedimentos mais comuns de reajustamento é a adição de dióxido de enxofre (SO_2) de maneira a proteger o vinho de fenómenos de oxidação. A escolha do vedante apropriado depende sempre das condições e do tempo de armazenamento que o vinho vai sofrer até chegar ao cliente final. O vedante é determinante para controlar a exposição do vinho ao oxigénio durante o tempo de conservação em garrafa e para conservar a qualidade do vinho protegendo-o de fenómenos de redução e oxidação (Silva & Teissedre, 2011).

A capacidade de vedação efetiva de um vedante é função de duas características: a permeabilidade do material que constitui o vedante e a aderência desse mesmo material à garrafa. Fatores como a posição de armazenagem, a razão entre o diâmetro do vedante e do gargalo da garrafa e o ar existente nos espaços vazios da rolha podem-se tornar muito importantes na quantidade de oxigénio que entra na garrafa (Poças *et al*, 2010).

O envelhecimento do vinho após engarrafamento tem que ser controlado de maneira a ter uma evolução no sentido da melhoria das propriedades sensoriais, e.g. odor, cor, etc. É necessário fazer um controlo da entrada de oxigénio na garrafa através do vedante, sendo por isso a escolha do vedante muito importante para evolução do vinho. A oxidação do vinho presente na garrafa, consequência da exposição ao oxigénio, altera os componentes de um vinho podendo provocar a sua deterioração. Esta deterioração ocorre a nível da estrutura molecular do vinho com consequências na sua qualidade, produzindo aromas e cores características (Figura 3) (APCOR, 2010).

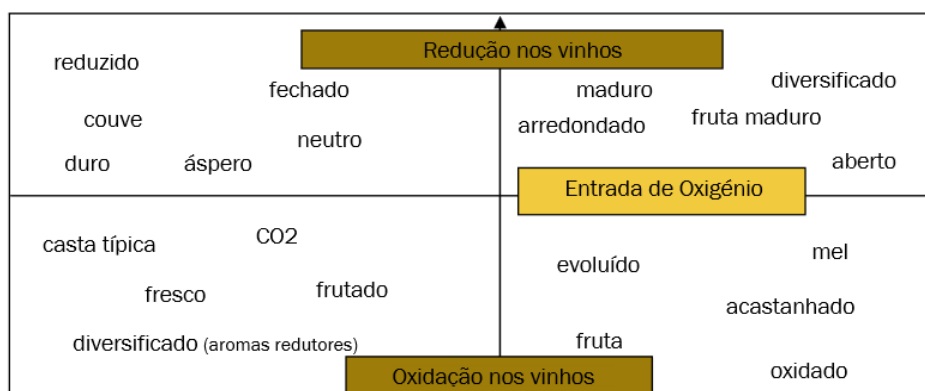


Figura 3 - Esquema de sensações que o vinho pode ter em função do processo de oxidação/redução (APCOR, 2010).

Com a preocupação crescente relativamente à transmissão de oxigénio para o interior da garrafa, na última década têm surgido estudos científicos sobre esta problemática. Os métodos inicialmente desenvolvidos eram destrutivos para o vedante, sendo atualmente usados os métodos de colorimetria e de quimiluminescência, não destrutivos e mais fiáveis. Os primeiros não permitiam o estudo evolutivo do controlo de oxigénio pois danificavam as propriedades dos vedantes, não sendo possível análises subsequentes do vinho. Os métodos mais recentes, não destrutivos, permitem acompanhar a evolução da transmissão de oxigénio para o vinho sem que a qualidade e as propriedades dos vedantes sejam danificados (Lopes *et al*, 2005). Os testes desenvolvidos ainda apresentam alguma variabilidade entre eles como se observa na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação de taxa de transmissão de oxigénio (TTO) após o primeiro mês entre dois estudos desenvolvidos (Silva & Teissedre, 2011)

Vedante	TTO, mL/dia ¹	TTO, mL/dia ²
Rolha de cortiça aglomerada	0,0001 - 0,0011	0,0006 - 0,0013
Cápsulas de rosca Saran	0,0001 - 0,0007	0,0002 - 0,0008
Cápsulas de rosca Saranex	0,001 - 0,003	
Rolhas de cortiça natural	0,0001 - 0,0130	0,0001 - 0,1227
Rolha sintética Nomacorc®	0,006 - 0,0130	0,005
Rolha sintética Supremecorq	0,011 - 0,024	

¹ Lopes *et al*, 2005

² Godden, 2004

A variabilidade dos valores obtidos principalmente para o caso das rolhas naturais e Nomacorc®, justifica a importância de comparar os resultados obtidos por diferentes métodos de estudo de transmissão de oxigénio de modo a comprovar e validar os estudos feitos, e a compreender as possíveis diferenças que podem existir entre eles.

1.5 Enquadramento e Apresentação do Projeto

Como anteriormente foi abordado, o estudo de transmissão de oxigénio ainda apresenta dificuldades de execução e, em alguns casos, diferentes valores para o mesmo tipo de vedante. De forma a conseguir comprovar os métodos usados e os estudos já realizados no departamento de I&D, surge este projeto com o objetivo de comparar dois métodos de medição de transmissão de oxigénio. Pretende-se acompanhar o desenvolvimento de três ensaios que têm por base dois métodos diferentes, colorimetria e quimiluminescência,

estando estes ensaios em iguais condições de conservação. Com este estudo será possível avaliar e entender que diferenças podem existir entre os dois métodos.

Como para além do vedante usado, também é importante ter em atenção a oxigenação que o engarrafamento provoca no vinho, foi aplicado um dos métodos abordados ao estudo da entrada de oxigénio num ensaio de engarrafamento em produção industrial. Este estudo demonstrará a utilidade e importância da aplicação deste tipo de método ao engarrafamento de vinhos, de forma controlar e melhorar os engarrafamentos efetuados.

1.6 Contributos do Trabalho

A Amorim & Irmãos S. A., a empresa líder do mercado mundial de rolhas de cortiça, consciente da crescente problemática do aparecimento de novos vedantes alternativos às rolhas de cortiça, criou, no ano de 2000, o departamento de I&D de forma a melhorar o desempenho técnico e sensorial dos seus produtos. O departamento de I&D trabalha na vanguarda do que é tecnologia da rolha e é responsável pela inovação no setor da cortiça e na geração de conhecimento sobre as propriedades da cortiça e a sua interação com o vinho. Sabendo da importância que o oxigénio tem no envelhecimento de bebidas tais como o vinho, o contributo deste projeto visa aumentar o conhecimento sobre os métodos de medição da transmissão de oxigénio, comparando e analisando três ensaios com base em dois métodos diferentes para o estudo da transmissão de oxigénio em diferentes vedantes. Adicionalmente, procurou-se criar modelos matemáticos preditivos da transmissão de oxigénio de forma a que num espaço temporal reduzido, se possa prever a quantidade de oxigénio ao longo do tempo de conservação para cada rolha.

1.7 Organização da Tese

Esta tese está dividida em 7 capítulos.

No primeiro capítulo faz-se uma breve apresentação da empresa Amorim & Irmãos, da matéria-prima essencial das rolhas produzidas nesta empresa e por fim, uma introdução ao estudo de transmissão de oxigénio através dos vedantes.

No segundo capítulo apresenta-se a caracterização das técnicas e métodos de estudo da transmissão de oxigénio, as principais dificuldades encontradas nos processos de engarrafamento e uma breve análise dos estudos já existentes sobre este tema, bem como os propósitos que levaram ao aparecimento deste projeto.

No terceiro capítulo descreve-se o trabalho experimental elaborado ao longo de todo o projeto, os diferentes ensaios realizados, as condições de operação, os métodos que foram utilizados durante este estudo e o procedimento experimental usado para a obtenção de resultados dos métodos realizados e do engarrafamento realizado.

No quarto capítulo apresenta-se os resultados obtidos através de cada técnica e ensaio, bem como a discussão dos resultados obtidos e todas as limitações que foram aparecendo ao longo do trabalho. Mostram-se também os resultados obtidos da aplicação de um dos métodos de estudo de transmissão de oxigénio a um engarrafamento.

No quinto capítulo apresenta-se as conclusões do trabalho desenvolvido, mostrando as principais metas alcançadas e as perspetivas futuras.

No sexto capítulo é feito um balanço do trabalho, dos objetivos que foram concluídos, apresentação de outros trabalhos desenvolvidos ao longo do projeto.

2 Contexto e Estado de Arte

O desenvolvimento dos vinhos é extremamente dependente da quantidade de oxigénio que recebem durante a vinificação e o envelhecimento. Algumas das oportunidades para que o oxigénio se transfira para o vinho ocorrem durante as operações de transmissão, o estágio em barril de madeira, filtragem, etc. Após o engarrafamento, a exposição ao oxigénio depende da eficácia dos vedantes, que diferem nas suas propriedades. A discussão sobre o impacto de diferentes vedantes no desenvolvimento dos vinhos após o engarrafamento leva à pergunta comum: os vinhos necessitam de oxigénio para um saudável envelhecimento? Alguma oxigenação do vinho parece ser importante sobretudo no caso do vinho tinto uma vez que as reações oxidativas até um determinado nível promovem a estabilização da cor e uma melhoria das propriedades sensoriais tais como a redução da adstringência. Por outro lado, a qualidade dos vinhos brancos é inversamente proporcional à quantidade de oxigénio consumida, uma vez que reduz a intensidade e a qualidade aromática do vinho. Este desenvolvimento negativo está frequentemente relacionada com a perda aromas frutados e o desenvolvimento de carateres oxidados, acompanhado por um escurecimento acelerado da cor (Lopes et al., 2009).

Durante a vinificação, as diferentes operações unitárias podem transmitir oxigénio da atmosfera para o vinho. Operações como o bombeamento, transporte, centrifugação, filtração, estabilização e engarrafamento são particularmente propícias à integração de oxigénio. No entanto, durante todo o processo de vinificação o vinho entra em contacto com o ar conduzindo a diferentes concentrações de oxigénio dissolvido. Durante a vinificação várias medidas corretivas podem ser tomadas com o objetivo de aumentar ou reduzir o contacto do vinho com o oxigénio ou mesmo dar-lhe proteção (adição de SO₂, ácido ascórbico, etc.) contra este gás. Ao contrário, durante e após o engarrafamento, a aplicação de medidas corretivas será muito mais difícil e todos os erros realizados nestas etapas irão ser observados alguns meses após o engarrafamento, muitas vezes no momento do consumo do vinho (Karbowski et al, 2010).

Após o engarrafamento, os vedantes têm um papel muito importante para a evolução do vinho, pois eles controlam as trocas gasosas entre a atmosfera e o vinho. Em 1933, Ribéreau-Gayon, mostrou que o oxigénio que entrava numa garrafa de vinho vedada com rolha de cortiça natural era residual e que este oxigénio era proveniente do ar existente na estrutura da rolha.

Face ao exposto acima, o estudo da transmissão de oxigénio tornou-se um tema muito relevante na indústria do vinho. Vários métodos foram sendo utilizados ao longo dos últimos

anos para estudar a transmissão de oxigénio dos diferentes vedantes. Entre os métodos utilizados destacam-se a medição do potencial de oxidação-redução, a medição do oxigénio dissolvido através de uma sonda polarográfica, a medição do oxigénio total numa garrafa usando um medidor de oxigénio baseado na lei de Henry ou a medição da composição do gás no *headspace* da garrafa usando cromatografia gasosa. Todos estes métodos, no entanto, são destrutivos, isto é o vedante é danificado durante a análise, o que impede o estudo cinético do oxigénio na garrafa ao longo do tempo (Brotto *et al*, 2010).

Mais recentemente foram desenvolvidos outros métodos não destrutivos tais como a determinação da oxidação do vinho através da medição da absorvância em garrafas limpas ou coloridas, a medição de ácido acético nas garrafas de vinho usando espectroscopia H NMR de alta resolução; contudo, estes métodos não medem diretamente o oxigénio. O método Mocon, que se baseia na medição da taxa de oxigénio usando um sensor coulométrico e a monitorização da migração de oxigénio através de cromatografia gasosa são dois métodos também utilizados; contudo, apenas podem ser aplicados a um número reduzido de rolhas e as condições de estudo são muito afastadas da realidade comercial. Estes métodos são aplicados em gargalos de garrafas de vinho com uma medição a seco o que significa que não se pode testar as rolhas nas suas reais condições de aplicação (Brotto *et al*, 2010).

O método cujas condições de estudo mais se aproxima da realidade é o sistema colorimétrico que se baseia na mudança de cor que provém das reações de oxidação-redução do carmin de índigo. Este método, uma vez calibrado, permite estudar a cinética de transmissão de oxigénio para o interior da garrafa de forma não destrutiva e avalia a cor da solução, sendo esta classificada segundo parâmetros específicos e rigorosos. Com o aumento progressivo da quantidade de oxigénio no interior da garrafa, a cor da solução vai se modificando, passando de amarelo até atingir o azul de índigo (Lopes *et al*, 2005). Estas mudanças de cor resultam num aumento do valor de luminosidade, que está inteiramente relacionada com a quantidade de oxigénio presente. As cores podem ser expressas em termos de tonalidade (cor), luminosidade (clara/escuro) e saturação (pureza). Estes três diferentes atributos podem ser dispostos de maneira a construir um sólido tridimensional. Com a ajuda do colorímetro, a identificação exata das cores torna-se mais fácil, obtendo-se os resultados das cores de um objeto em diferentes espaços de cor.

Utilizando o método colorimétrico, Lopes *et al*. (2005), estudaram a transmissão de oxigénio através de três tipos de vedantes (rolhas naturais, rolhas técnicas e rolhas sintéticas). Os resultados mostraram que os vedantes sintéticos são permeáveis ao oxigénio atmosférico permitindo a entrada deste gás a taxas bastante elevadas (0,85 mg de O₂/L/mês após primeiro mês). As rolhas de cortiça, naturais e técnicas, são essencialmente impermeáveis ao oxigénio atmosférico; contudo, devido à compressão nas garrafas, as rolhas

libertam oxigénio da sua estrutura, que é mais significativo momentos após o engarrafamento e vai diminuindo ao longo do tempo de conservação até chegar a uma estabilização após alguns meses em garrafa (0,50 e 0,10 mg de O₂/L/mês após primeiro mês respectivamente) (Lopes *et al*, 2005). Outros vedantes, como sejam o caso das cápsulas de rosca, são impermeáveis ao oxigénio atmosférico não libertando oxigénio para o interior da garrafa de vinho (Lopes *et al*, 2006). Adicionalmente, mostrou-se que após 38 meses de conservação, a transmissão de oxigénio dos diferentes vedantes não está dependente da posição de conservação da garrafa (Lopes *et al*, 2005).

Recentemente, foi desenvolvido outro método para medição de oxigénio em garrafa que se baseia na técnica de quimiluminescência. Este método foi desenvolvido e comercializado recentemente pelas empresas PreSens e OXYSense, responsáveis pelo desenvolvimento de todo o tipo de sensores para diferentes tipos de indústrias como, por exemplo, submarinos (para avaliar óleos e gás), a oceanografia, o espaço, etc. (Homepage: OxySense, 2013; Home: Presens, 2013).

Este método utiliza sensores que são colocados na parte interna das paredes das garrafas o que elimina as desvantagens dos processos de medição eletroquímicos e baseia-se na excitação de moléculas de oxigénio através de uma radiação. Existe uma relação entre a concentração de oxigénio na amostra e a intensidade e tempo de vida da luminescência, que é expresso por uma equação específica usada pelo equipamento para a tradução do sinal em concentração de oxigénio (Huber *et al*, 2006).

Um grupo de investigadores da empresa produtora de rolhas sintéticas Nomacorc®, aplicou em 2011, a tecnologia de quimiluminescência a garrafas vazias, para o estudo de transmissão de oxigénio em 3 diferentes tipos de rolhas sintéticas. Obtiveram valores de transmissão de oxigénio de 0,0222, 0,0337 e 0,0179 mL/dia para cada um dos vedantes estudados (Déval, 2011).

Em 2010, Vidal e Chatvialle fizeram um estudo, usando o método de quimiluminescência, para estudar a transmissão de oxigénio através de cápsulas de rosca para garrafas de vinhos com uma solução aquosa de HCl com pH 1,5. Com este estudo conclui-se que os dois diferentes vedantes usados, Saranex e Saran tin, apresentavam taxas de transmissão de oxigénio diferentes entre si. As capsulas de rosca Saran Tin não apresentavam transmissão de oxigénio para o interior da garrafa enquanto que as cápsulas de rosca Saranex apresentavam uma taxa de transmissão de oxigénio constante ao longo do tempo e variável proporcionalmente ao aumento da temperatura (2,55 e 4,02 µg/dia/garrafa para temperaturas de 20 e 35 °C, respectivamente) (Vidal & Chayvialle, 2010).

O departamento I&D da A&I, consciente do novo método de quimiluminescência aplicado à medição de oxigénio em garrafas de vinho, e tendo como método de referência a

colorimetria, decidiu comparar estes métodos no sentido de potenciar o conhecimento sobre a cinética de entrada de oxigénio numa garrafa a partir dos diferentes vedantes.

O departamento de I&D da A&I têm implementado o método colorimétrico, sendo este método usado nos estudos realizados para a determinação da cinética de migração de oxigénio através de vedantes, mas, com o surgimento do novo método de quimiluminescência, a empresa quer perceber as diferenças entre este novo método e o método de colorimetria usado. A colorimetria e a quimiluminescência utilizam métodos diferentes de análise da taxa de transmissão de oxigénio ao longo do tempo, contudo, tem a vantagem de ambos não serem destrutivos.

O principal objetivo deste trabalho é comparar a transmissão de oxigénio através de diferentes vedantes de vinho utilizando o método colorimétrico e o método da quimiluminescência. A aplicação do método da quimiluminescência a um caso real de engarrafamento também permitiu explorar a utilidade deste método na medição de oxigénio em etapas de produção de vinho (engarrafamento), onde a técnica colorimétrica não pode ser aplicada.

3 Descrição Técnica

Ao longo deste capítulo faz-se uma introdução ao trabalho experimental, procurando apresentar e explicar as técnicas da colorimetria e da PreSens/quimiluminescência, bem como o modo operativo para todos os ensaios realizados, incluindo a aplicação da tecnologia PreSens para medição do oxigénio no momento do engarrafamento.

Durante este trabalho foram estudados duas diferentes metodologias de transmissão de oxigénio através de diferentes vedantes. Para o método da colorimetria foi realizado apenas 1 ensaio enquanto para o método da quimiluminescência foram realizados 2 tipos de ensaios: um ensaio foi realizado com a garrafa vazia e o outro com a garrafa preenchida com solução aquosa de ácido clorídrico (HCl).

3.1 Comparação de métodos de estudo de transmissão de oxigénio

3.1.1 Materiais

3.1.1.1 Vedantes em estudo

Os vedantes seleccionados para estes estudos foram os seguintes (Figura 4):

- 1) Rolhas Naturais (45 x 24 mm) da A&I;
- 2) Rolhas técnicas Neutrocork® (45 x 24 mm) da A&I;
- 3) Rolhas sintéticas Nomacorc® Select 300 (44 x 23 mm) adquiridas à Korken & Schiesser (Áustria).

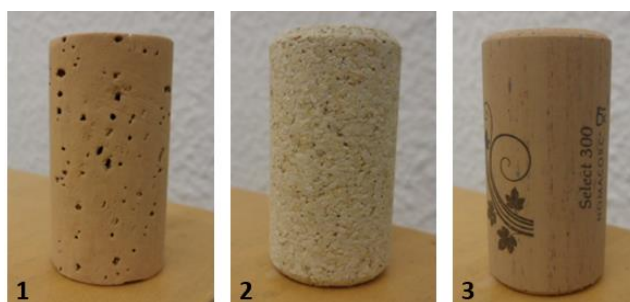


Figura 4 - Amostras em estudo: (1) rolhas de cortiça natural, (2) rolhas Neutrocork®, (3) rolhas Nomacorc®.

Foram analisadas 50 rolhas de cada tipo no MedCork com objetivo de determinar as suas dimensões, humidade, massa e massa volúmica.

3.1.1.2 Garrafas

As 60 garrafas usadas neste projeto são garrafas de vidro transparentes do tipo bordalesa, com um volume de 0,375 L, cujo nível de enchimento é cerca de 62 mm a partir da entrada do gargalo. O perfil interno apresenta um diâmetro de 19,2 mm a 3 mm do topo da garrafa e 20 a 21 mm a 45 mm de profundidade.

3.1.2 Métodos

3.1.2.1 Método colorimétrico

O método colorimétrico, como já foi mencionado anteriormente, baseia-se na mudança de cor que provém das reações de oxidação-redução de um indicador, carmim de índigo. A partir destes sistemas de mudança de cor é possível estudar a cinética de entrada do oxigênio dentro da garrafa ao longo do tempo sem comprometer as propriedades do vedante.

As reações de redução do carmim de índigo pelo ditionato de sódio e da oxidação da solução reduzida de carmim de índigo pelo oxigênio atmosférico são descritas na Figura 5. A reação A representa a primeira fase, em que se procede à redução do carmim de índigo, passando a solução de azul para amarela e a reação B representa a oxidação do carmim de índigo (Lopes *et al*, 2005).

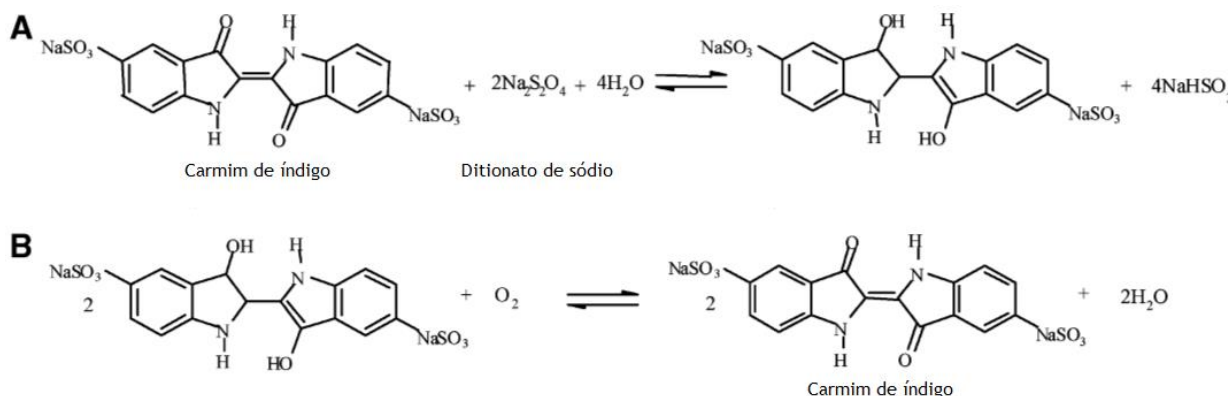


Figura 5 - Reação de redução do carmim de índigo pelo ditionato de sódio (A) e oxidação do carmim de índigo através de oxigênio (B) (Lopes *et al*, 2005).

O equipamento usado para realizar as medições é um colorímetro de Minolta series CM-508i, apresentado na Figura 6 em que a garrafa é colocada no interior da caixa e sujeita a uma medição de espaço de cor (L*, a*, b*). Este espaço de cores, também chamado de CIELAB, é um dos esquemas de medição mais usado atualmente e apareceu com o intuito de reduzir os erros encontrados nos espaços concorrentes, representando o L* a luminosidade, o a* a saturação e o b* a tonalidade.



Figura 6 - Colorímetro.

3.1.2.2 Calibração do método da colorimetria

A calibração deste método está dividida em duas partes, e foi realizada usando uma garrafa diferente das convencionais garrafas de vinho, como se pode observar na Figura 7. Esta garrafa tem um volume de 375 mL contendo 2 aberturas, as quais são tapadas com anéis de silicone com 5 mm de espessura.

Em primeiro lugar, procedeu-se à redução do carmim de índigo na garrafa de calibração (Figura 7). Esta é preenchida com 350 mL de solução de carmim de índigo e as duas aberturas são fechadas, seguindo-se a remoção do oxigénio do interior da garrafa com azoto puro durante 10 minutos e à pressão de 0,5 bar. No fim deste período, uma solução aquosa de ditionato de sódio (4 mg/mL) foi injetada na garrafa conduzindo à alteração da cor da solução de carmim de índigo: de azul de índigo (estado oxidado) para amarelo (solução completamente reduzida). Após a redução do carmim de índigo, a garrafa foi submetida às medições de CIELAB (L^* , a^* , b^*) que foram realizadas em quatro pontos da garrafa que representam os 4 ângulos de 90° para obter um valor médio. As medições foram realizadas no escuro e à temperatura ambiente (21 °C) (Lopes *et al*, 2005).

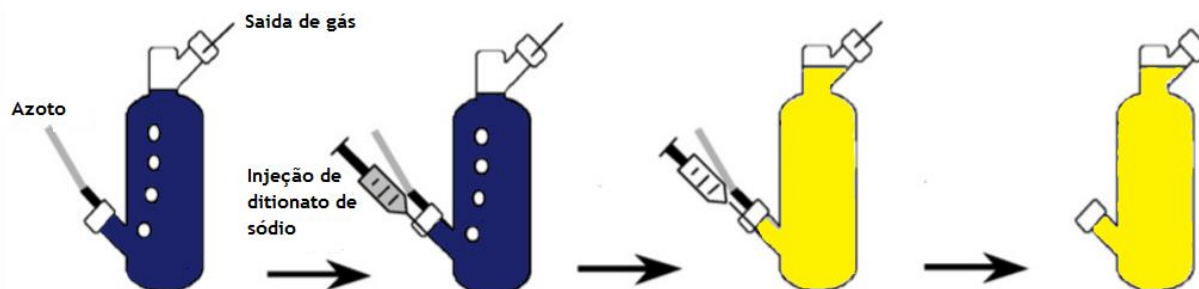


Figura 7 - Procedimento de redução do carmim de índigo (adaptado de Lopes *et al*, 2005).

Após realizada a redução da solução ensaio, prosseguiu-se para a calibração do carmim de índigo (Figura 8). Fizeram-se injeções de 0,7 mL de ar atmosférico (0,15 mL de oxigénio) a partir da abertura lateral superior de silicone da garrafa. Após a remoção da seringa e agulha, a garrafa foi agitada vigorosamente à mão durante 1 minuto para homogeneizar a solução de carmim de índigo, seguindo-se um período de estabilização de 5 minutos; período após o qual foram realizadas as medições de cor. Este procedimento foi repetido o número de vezes necessário até a oxidação total do carmim de índigo, isto é, até que a solução apresentasse a cor azul inicial (Lopes *et al*, 2005).

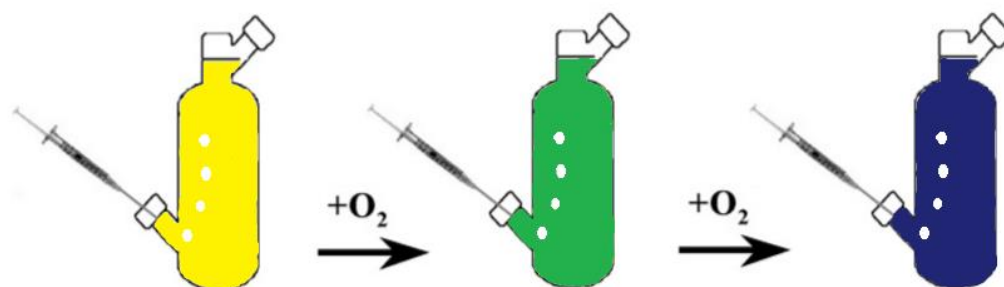


Figura 8 - Procedimento de oxidação do carmim de índigo (adaptado de Lopes *et al*, 2005).

3.1.2.3 Ensaios de engarrafamento / conservação - método colorimétrico

Foram preparados 8 L de solução aquosa (água desionizada) contendo carmim de índigo (250 mg/L) e benzoato de sódio (5 g/L), e foram colocados 350 mL desta solução mãe no interior de cada garrafa de vidro (Lopes *et al*, 2005). A solução no interior da garrafa foi em seguida submetida ao procedimento de redução semelhante ao realizado durante a calibração: passagem de uma corrente de azoto puro durante 10 minutos para remover todo o oxigénio da garrafa, período após o qual foram injetados 20 mL de solução de ditionato de sódio (4 mg/mL) para promover a redução total do ditionato de sódio presente na solução. A solução em garrafa já reduzida foi colocada na arrolhadora industrial onde foi inserida a rolha no gargalo, sob vácuo. Este último procedimento foi ser realizado rapidamente de modo a reduzir a exposição da solução ao ar atmosférico.

Neste ensaio foram testadas 20 rolhas, o que corresponde a cinco rolhas Nomatic® Select 300, cinco rolhas Neutrocork® e dez rolhas de cortiça natural. A maior heterogeneidade de performance das rolhas naturais justificou o uso do dobro de rolhas. As 20 garrafas foram em seguida conservadas em posição vertical e à temperatura ambiente (21 °C) durante 55 dias.

3.1.2.4 Método de Quimiluminescência

O esquema apresentado na Figura 9 explica o princípio em que se baseia este método.

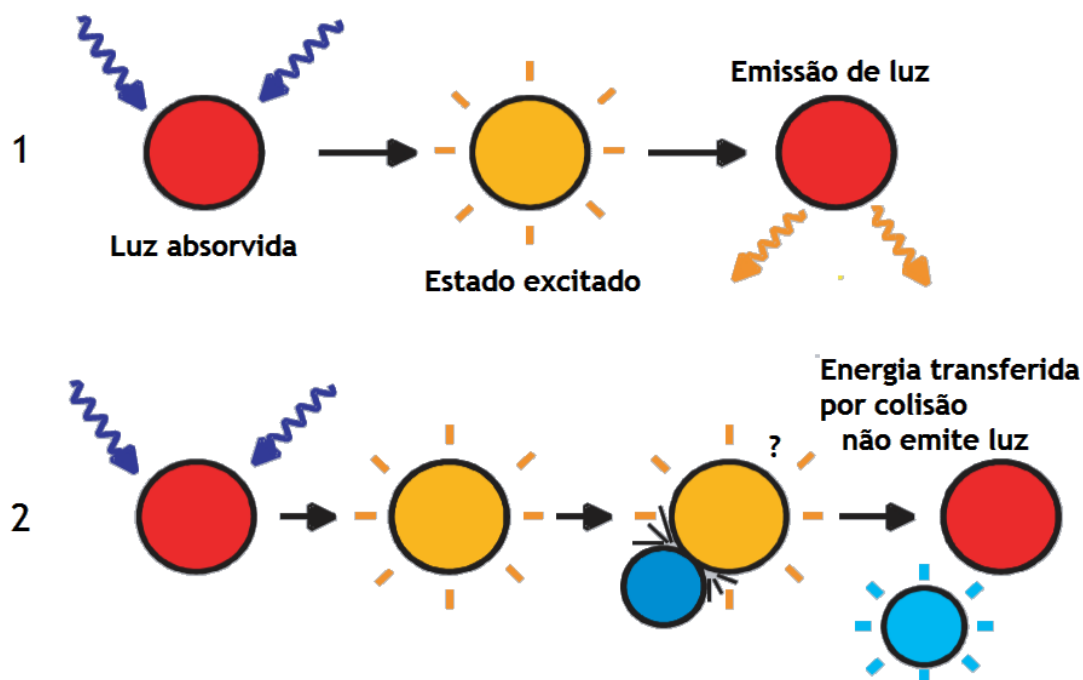


Figura 9 - Princípio da dinâmica de luminescência (adaptado de Huber *et al*, 2006).

A fibra ótica emite uma radiação com uma cor azulada que funciona como excitador das moléculas de oxigénio. Esta luz é emitida a uma frequência de 4,5 kHz para iluminar corretamente o sensor, e a fibra ótica usada serve como transdutor do sinal. As moléculas de oxigénio ao absorverem esta radiação emitem uma resposta ao sensor, que por sua vez é captada pela fibra. Os sensores de oxigénio são colocados na parte interna da parede da garrafa e a fibra ótica é colocada no exterior junto ao sensor (Figura 10). É assim possível medir a concentração de oxigénio no interior de uma garrafa cheia, de modo não invasivo e não destrutivo para a amostra a ser analisada. Esta metodologia é passível de ser usada não só com vinho mas também com outro tipo de bebidas engarrafadas. Estes sensores são capazes de medir a concentração de oxigénio dissolvido na solução ou então no chamado *headspace* da garrafa, através de materiais transparentes (até uma espessura de 10 milímetros) ou até mesmo de embalagens turvas. Na Figura 10 apresenta-se uma imagem do equipamento usado ao longo do projeto, medidor de quimiluminescência da Fibox 3 LCD-trace.

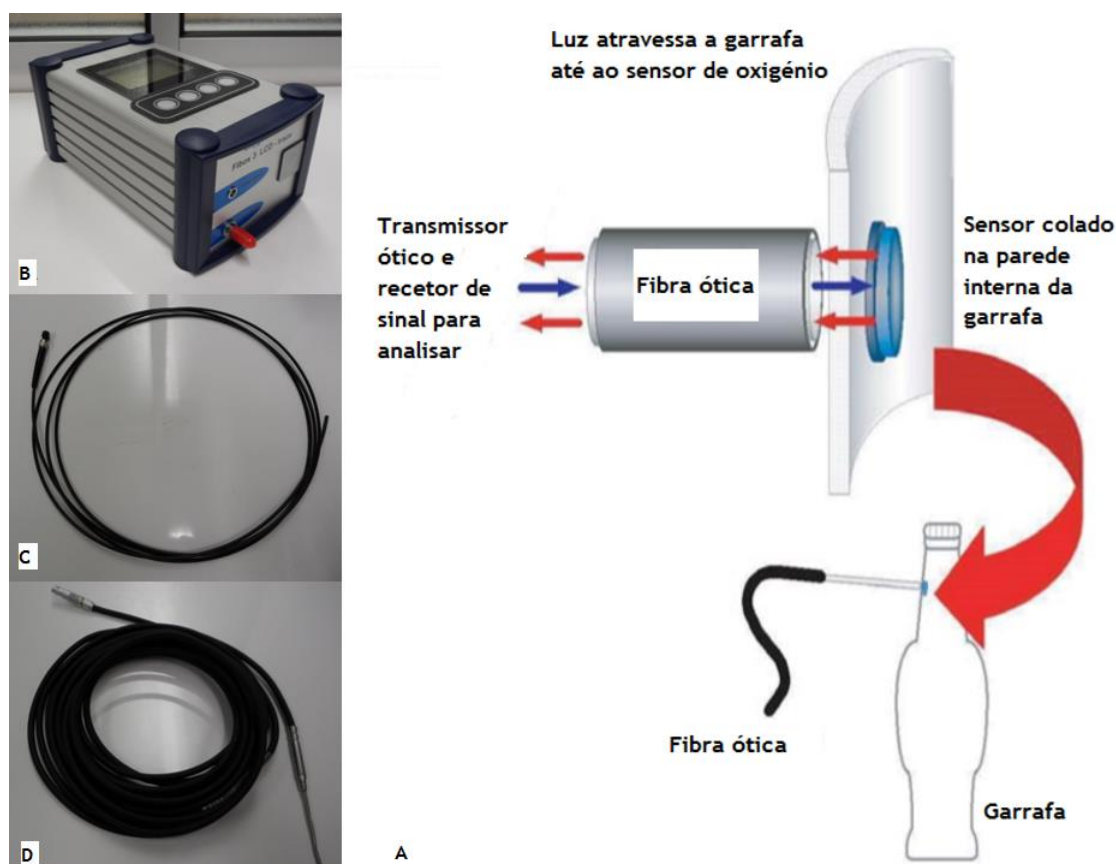


Figura 10 - Esquema representativo da medição da concentração de oxigénio através do método da quimiluminescência (A) e do equipamento usado: (B) Equipamento, (C) Fibra ótica, (D) Sensor de temperatura (adaptado de Huber *et al*, 2006).

3.1.2.5 Calibração do equipamento de quimiluminescência

Para este método, o equipamento e os sensores foram fornecidos já calibrados, sendo a calibração dos sensores variável com o lote de produção e os valores necessários para serem introduzidos no sistema são fornecidos pela empresa. Neste caso os sensores usados foram PSt6 (Tabela 3 e Anexo 1).

Tabela 3 - Gama de medição e limites de deteção dos sensores PSt6 (Huber *et al*, 2006)

	Oxigénio Dissolvido	Oxigénio dissolvido e gasoso
Gama de medição	0 - 1,8 mg/L (ppm) 0-56,9 μ mol	0 - 4,2% Oxigénio saturado 0 - 41,4 hPa
Limite de deteção	1ppm de oxigénio dissolvido	0,002% Oxigénio

3.1.2.6 Ensaios de engarrafamento / conservação - método de quimiluminescência

- Ensaio em garrafas vazias

Num primeiro ensaio, as garrafas vazias com um sensor Pst6 pré-instalado (a 100 mm do topo do gargalo) foram submetidas a um procedimento de remoção do oxigénio durante 10 minutos com uma corrente de azoto puro, período após o qual a rolha foi inserida na garrafa sob vácuo (Figura 11). Tal como nos ensaios anteriores foram engarrafadas e arrolhadas 20 garrafas, cinco com rolhas Nomatic® Select 300, cinco com rolhas Neutrocork® e dez com rolhas de cortiça natural.



Figura 11 - Garrafa usada nos ensaios realizados com garrafa vazia.

- Ensaio em garrafas com solução ácida

Num primeiro ensaio preparou-se 8 L de solução aquosa de HCl a 0,3 % com pH 1,56 (Vidal & Chayvialle, 2010), tendo sido colocados 370 mL desta solução em garrafas com dois sensores PSt6 pré-instalados: um 53 mm do topo do gargalo para medir o oxigénio no *headspace* (OHS) e outro a 100 mm do topo do gargalo para medir o oxigénio dissolvido (OD) (Figura 12).

Em seguida estas garrafas foram submetidas a um procedimento semelhante ao do método da colorimetria, isto é remoção do oxigénio durante 10 minutos com uma corrente de azoto puro, período após o qual as rolhas foram inseridas nas garrafas sob vácuo. No total foram engarrafadas e arrolhadas 20 garrafas, cinco com rolhas Nomatic® Select 300, cinco com rolhas Neutrocork® e dez com rolhas de cortiça natural.

As garrafas de ambos os ensaios foram conservadas em posição vertical e à temperatura ambiente (21 °C) durante 55 dias.



Figura 12 - Garrafa usada no ensaio realizado com solução ácida.

3.1.3 Medições periódicas

As medições de transmissão de oxigénio foram realizadas no mesmo local de conservação das amostras sob condições de temperatura ambiente (21 °C).

Depois de realizados todos os engarrafamentos, acompanhou-se a evolução da transmissão de oxigénio durante 55 dias. Todas as medições realizadas ao longo do tempo de análise foram previamente definidas e realizadas de maneira a que os pontos de análise fossem iguais entre os diferentes ensaios para uma melhor análise e comparação.

No caso do método de colorimetria, apenas os valores de L^* foram tomados em consideração pois é através destes valores que se obtém uma correlação com a concentração de oxigénio dissolvido na solução (OD). Para que se possa reduzir o erro associado a imperfeições que as garrafas possam ter, o valor final é a média de 4 medições, fazendo uma rotação de 90° entre cada uma com a garrafa sempre em posição vertical. Os valores de L^* obtidos são convertidos em volume de oxigénio dissolvido (em mL) através da equação da reta de calibração do método (Figura 13) e posteriormente são convertidos em massa de oxigénio dissolvido (OD) (em mg).

No caso dos ensaios usando o método de quimiluminescência, a quantidade de oxigénio presente na garrafa foi medida em diferentes unidades: no caso dos sensores que se situavam no *headspace* da garrafa os valores foram considerados em hectoPascal (hPa) e para os sensores colocados em contato com o líquido presente na garrafa, os valores foram considerados em mg/L. Os valores de oxigénio obtidos em unidades hectoPascal (OHS) são posteriormente convertidos para massa de oxigénio (em mg) através da equação dos gases

perfeitos usando os valores de temperatura ambiente registados no momento de cada leitura. A medição de oxigénio foi efetuada durante e imediatamente após o engarrafamento, assim como a intervalos de tempo pré-definidos e de acordo com os tempos de medição do método de colorimetria. O valor de oxigénio total (OT) corresponde ao somatório do oxigénio presente no *headspace* (OHS) e do oxigénio dissolvido na solução (OD).

3.1.4 Estudo de pressão

Para cada um dos ensaios usaram três amostras correspondendo aos diferentes tipos de rolhas usadas no engarrafamento (rolhas Naturais, rolhas técnicas Neutrocork®, rolhas Nomacorc®) para melhor entender o funcionamento do efeito de vácuo sobre o engarrafamento. No caso do ensaio em garrafas com as soluções, analisadas pelo método de colorimetria e método de quimiluminescência (garrafas com solução ácida), os valores de pressão relativa existente na garrafa após o engarrafamento são maiores (-0,10 bar) que a pressão relativa existente na garrafa vazia (-0,25 bar). Esta diferença está relacionada com a ausência de líquido na garrafa vazia, o que faz com que o efeito de sucção seja sentido com maior intensidade.

3.1.5 Tratamento estatístico

Todos os resultados obtidos foram tratados estatisticamente usando o *software* XLSTAT, realizando uma análise de variância (ANOVA) e de correlação.

3.2 Aplicação do método de quimiluminescência a um ensaio de engarrafamento / conservação de vinho

Numa tentativa de explorar todo o potencial do método de quimiluminescência, ao longo deste trabalho, fez-se o acompanhamento de um estudo para compreender o impacto de diferentes revestimentos de rolhas de cortiça natural na evolução de um vinho branco. Neste estudo, um dos parâmetros analisados foi a evolução da transmissão de oxigénio durante o engarrafamento e o período de conservação em garrafa que foi analisado por quimiluminescência. O estudo foi realizado com vinho branco da Casa Agrícola Herdade do Monte da Ribeira (HMR) que se situa em Pedrogão, Vidigueira, Distrito de Beja.

3.2.1 Garrafas

Foram usadas 250 garrafas de vidro do tipo bordalesa *seduction* transparente com um volume de 750 mL. O nível de enchimento desta garrafa foi aproximadamente cerca de 63 mm a partir da entrada do gargalo e o perfil interno apresenta um diâmetro de 18,5 mm a 3 mm do topo da garrafa e 20 a 21 mm de diâmetro a 45 mm de profundidade. Para além das 250 garrafas usadas no engarrafamento, foram levadas do departamento I&D, 4 garrafas transparentes (com características semelhantes às garrafas utilizadas nos ensaios avaliados pelo método de quimiluminescência) contendo os sensores PSt6 para se realizar o estudo de transmissão de oxigénio.

3.2.2 Rolhas

As rolhas usadas neste estudo pertencem a um lote de produção de 100 mil rolhas naturais de dimensões 45 x 24 mm, de 2º classe e lavadas em Clean 2000. Deste lote foram fabricados industrialmente e com acompanhamento na produção os produtos apresentados na Tabela 4. De cada um dos produtos (amostras 1 a 5) foram retiradas 100 rolhas aleatoriamente, tendo sido usadas 50 rolhas no ensaio de engarrafamento na HMR e a outras 50 foram submetidas a ensaios de controlo dos parâmetros físico-mecânicos, análise visual e teor de oxidantes. Todas as rolhas utilizadas no engarrafamento foram tratadas na empresa Amorim e Distribuição (AD) com um tratamento convencional que contém parafina e silicone e de seguida o grupo de rolhas controlo foi analisado no MedCork para determinação das dimensões, teor de humidade e massa volúmica.

Tabela 4 - Amostras usadas no engarrafamento do vinho HRM na Vidigueira

Amostra	Quantidade	Revestimento	Dimensões
1	20 000	Aquamark	45 x 24 mm
2	20 000	Clean C	45 x 24 mm
3	20 000	Nova Colmatagem	45 x 24 mm
4	20 000	Colmatado Revestido Creme	45 x 24 mm
5	20 000	Clean 2000	45 x 24 mm

3.2.3 Ensaio de engarrafamento / conservação do caso real

O engarrafamento decorreu no dia 23 de abril de 2013 nas instalações da HMR. O ensaio ocorreu durante o engarrafamento normal do vinho referido. O engarrafamento decorreu à temperatura ambiente (22 °C), encontrando-se o vinho a 20°C. A linha de engarrafamento foi parada, a tremonha da arrolhadora esvaziada e as rolhas usadas no ensaio foram colocadas no interior da tremonha todas misturadas. O engarrafamento usando as 250 rolhas em ensaios

decorreu nas mesmas condições que as usadas no engarrafamento de garrafas para distribuição. As únicas interrupções existentes foram realizadas para colocar as quatro garrafas com sensores PSt6 para medição do oxigénio durante os quinze minutos que demorou a operação, tendo sido introduzidas com intervalos de tempo de três minutos. No final do engarrafamento, todas garrafas foram colocadas diretamente em caixas de seis garrafas e posteriormente enviadas para a Amorim & Irmãos, onde chegaram após uma semana. Foram conservadas em posição horizontal sob condições de temperatura ambiente (21 °C).

3.2.4 Análises químicas e físico-mecânicas

As análises químicas ao vinho foram efetuadas no Laboratório da Comissão de Viticultura dos Vinhos Verdes e decorreram três dias após o engarrafamento em três garrafas retiradas do ensaio de engarrafamento e os parâmetros analisados foram os seguintes: título alcoométrico volúmico, massa volúmica, teor de açúcares redutores, acidez total, acidez volátil, pH, teor de SO₂ livre e SO₂ total, teor de ácido ascórbico e cor do vinho (leitura da absorvância a 420 nm). Após um mês do engarrafamento foram apenas avaliados em três os parâmetros: cor do vinho, teor de SO₂ livre e SO₂ total.

Em paralelo foram realizadas as análises de medição de oxigénio nas quatro garrafas com sensores PSt6. Estas análises foram realizadas no departamento de I&D da A&I. Os ensaios físico-mecânicos, tais como determinação de forças de extração e absorção ao líquido também foram efetuadas após um mês do engarrafamento de acordo com as normas internas da empresa.

4 Discussão dos resultados

4.1 Dimensões dos vedantes em estudo

Na Tabela 5 são apresentados os valores médios das dimensões e propriedades dos diferentes vedantes usados nos ensaios.

Tabela 5 - Média das dimensões e propriedades dos vedantes usados

Vedante	Humidade / %	Comprimento / mm	Diâmetro Médio / mm	Massa / g	Massa Volúmica / kg·m ³
Natural	5,7 (0,39)	45,2 (0,13)	24,1 (0,16)	3,6 (0,36)	174 (17,85)
Neutrocork®	5,6 (0,11)	44 (0,21)	23,9 (0,06)	5,5 (0,12)	280 (4,78)
Nomacorc®	-	44	23	-	328

Os valores apresentados entre parênteses representam o desvio-padrão.

4.2 Transmissão de oxigénio de diferentes vedantes de vinhos medido por diferentes métodos

4.2.1 Medição da transmissão de oxigénio pelo do método de colorimetria

Todo o procedimento de calibração foi efetuado três vezes, sendo que a curva de calibração final representa a média das três calibrações (Figura 13).

Esta curva é constituída por duas partes distintas. Na fase inicial, a curva tem um comportamento aproximadamente constante devido ao excesso de ditionato de sódio que se adicionou em solução. Como existe uma quantidade de reagente que não foi necessária para a redução da solução de carmim de índigo, ao injetar-se 0,15 mL de oxigénio, este vai primeiro consumir esse reagente em excesso e só posteriormente oxidar a solução. Após o consumo do excesso de reagente, ao adicionar-se oxigénio proporciona-se a oxidação da solução de carmim de índigo, alterando a sua cor. A solução passa de amarelo até azul de índigo, o que se reflete na evolução do parâmetro L* da solução (Lopes *et al*, 2005).

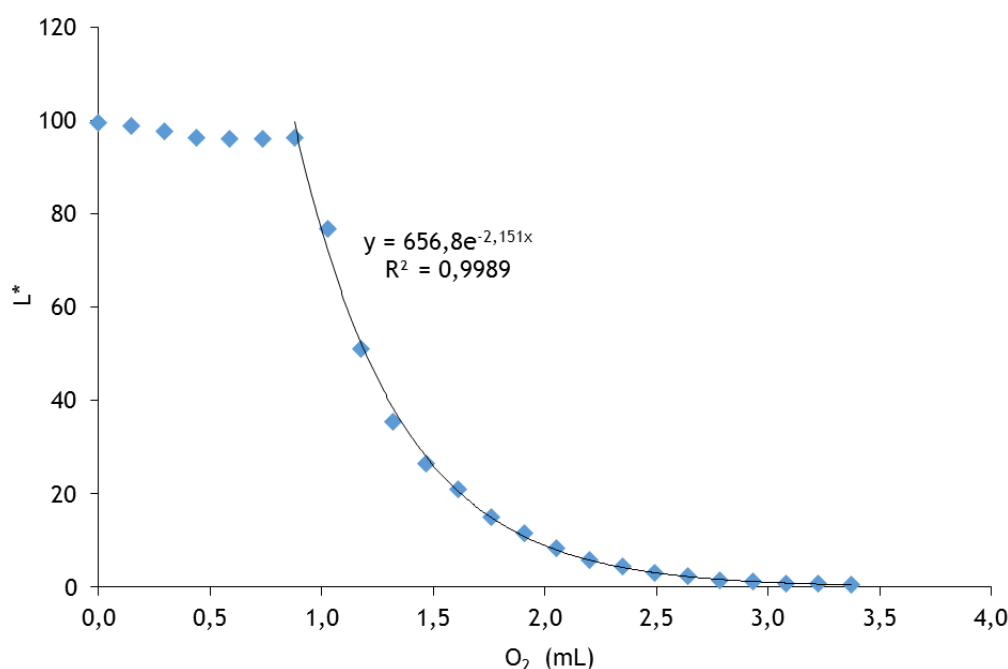


Figura 13 - Curva de calibração para o método da colorimetria.

Ao longo dos 55 dias foi analisada, através do colorímetro, a mudança de cor da solução que traduz a transmissão de oxigénio através de cada vedante (média de 5/10 garrafas de acordo com o tipo de vedante usado). As cinéticas de transmissão de oxigénio através dos diferentes vedantes estão representadas na Figura 14. Observa-se que nos primeiros 5 dias de análise existe uma elevada transmissão de oxigénio devido em grande parte ao engarrafamento. Após este período inicial, há uma evolução mais gradual da quantidade de oxigénio, mais acentuada no caso das rolhas de cortiça natural e rolhas Nomacorc®, apresentando aproximadamente 3,25 mg e 2,25 mg ao final de 55 dias, respetivamente. Os vedantes apresentam taxas de transmissão de oxigénio de 0,012, 0,009 e 0,014 mg/dia para as rolhas de cortiça natural, rolhas Neutrocork® e rolhas Nomacorc®, após o primeiro mês de análise. Comparando estes valores com os apresentados na literatura (0,0062, 0,0012 e 0,0105 mg/dia respetivamente) (Lopes *et al*, 2005), estes apresentam valores um pouco elevados. Este facto está relacionado com o número reduzido de dias que este ensaio tem após o primeiro mês. Os três vedantes para este ensaio são estatisticamente idênticos, não existindo diferenças significativa ($p > 0,05$).

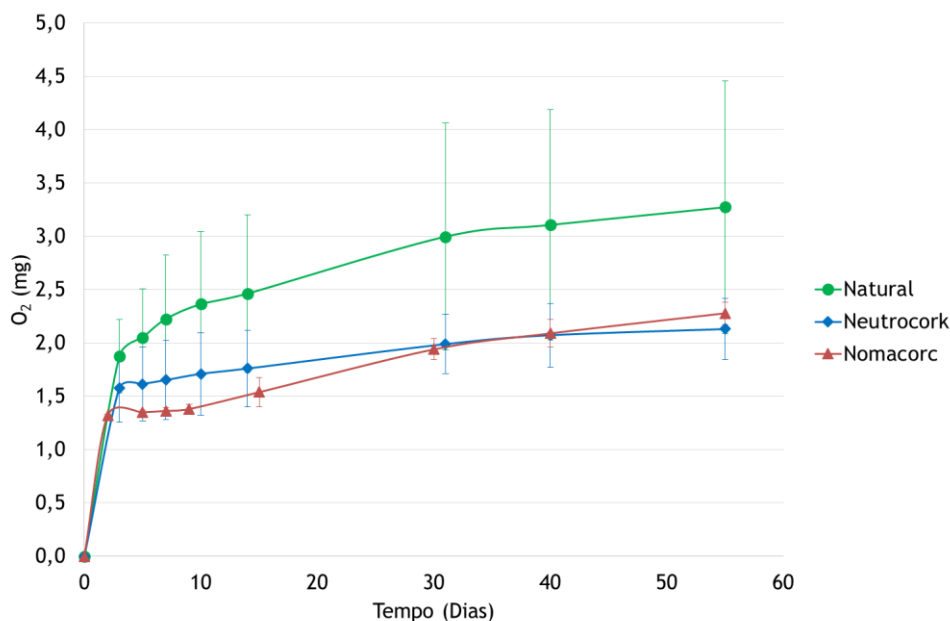


Figura 14 - Cinética de transmissão de oxigénio ao longo do tempo de conservação para o método da colorimetria ao longo do tempo de conservação.

4.2.2 Medição da transmissão de oxigénio pelo método de quimiluminescência

4.2.2.1 Ensaio em garrafas vazias

No ensaio em garrafas vazias (Figura 15) não é observado o efeito do engarrafamento devido ao fenómeno de sucção efetuada pelo vácuo durante a etapa de engarrafamento, com remoção de oxigénio do interior da garrafa, existindo assim uma transmissão mais gradual de oxigénio. Neste ensaio apenas é determinado o oxigénio total (OT). As rolhas de cortiça natural apresentam uma grande variabilidade e elevados valores de quantidades de oxigénio ao longo dos 55 dias de análise. As rolhas de cortiça natural, rolhas Neutrocork® e rolhas Nomaticorc® apresentam uma transmissão de OT aproximadamente 5,75, 1,0 e 1,8 mg ao final de 55 dias, respetivamente. Os vedantes Nomaticorc® apresentam taxas de transmissão de oxigénio de 0,014 mg/dia após o primeiro mês de análise. Os três vedantes para este ensaio são estatisticamente idênticos, não existindo diferenças significativas comparando o último ponto de análise ($p > 0,05$).

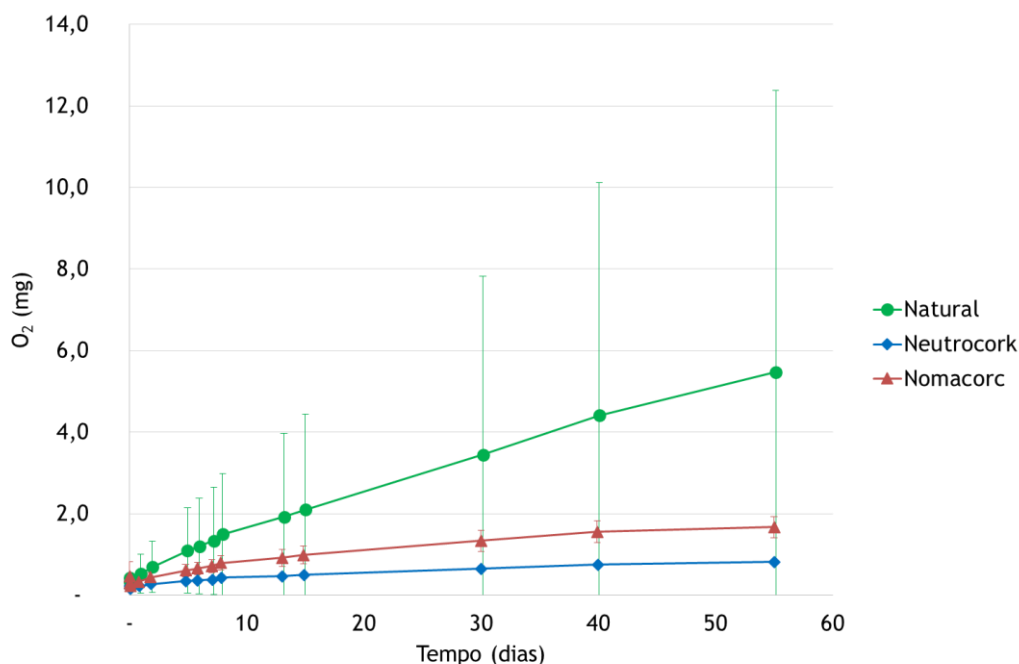


Figura 15 - Cinéticas de transmissão de oxigénio através de diferentes vedantes medidos por quimiluminescência para as garrafas vazias ao longo do tempo de conservação.

4.2.2.2 Ensaio em garrafas com solução ácida

Ao longo do tempo de análise (Figura 16), observa-se um elevado aumento da quantidade total de oxigénio nos primeiros dias de análise para todas as rolhas estudadas. Para as rolhas de cortiça, aproximadamente a partir do sétimo dia este tipo de vedantes apresenta uma diminuição constante ao longo dos restantes dias, o que não acontece com as rolhas Nomaticorc® em que a quantidade de oxigénio aumenta gradualmente ao longo dos 55 dias de análise. Para as rolhas Nomaticorc®, estas atingem uma quantidade total de oxigénio (OT) presente na garrafa de aproximadamente 1,50 mg. Os três vedantes para este ensaio apresentam diferença significativas ($p < 0,05$), sendo que as rolhas de cortiça se situam num grupo estatisticamente diferentes.

Neste ensaio com a solução ácida, os resultados indicam que existe um consumo de oxigénio pela solução ou algo que esteja no interior da garrafa, principalmente no caso das rolhas de cortiça, natural e técnica (Neutrocork®). Por observação foi possível identificar algumas estruturas na parte interna da rolha e no gargalo que parecem ser microrganismos. Esta contaminação, principalmente observada nas rolhas de cortiça (Figura 17), poderá explicar o consumo o oxigénio observado. Este ensaio foi realizado durante os 55 dias de conservação; contudo, os resultados obtidos com este ensaio não são válidos pois houve um

consumo de oxigénio não permitindo fazer o estudo de transmissão de oxigénio ao longo do tempo, consumido pelos microrganismos.

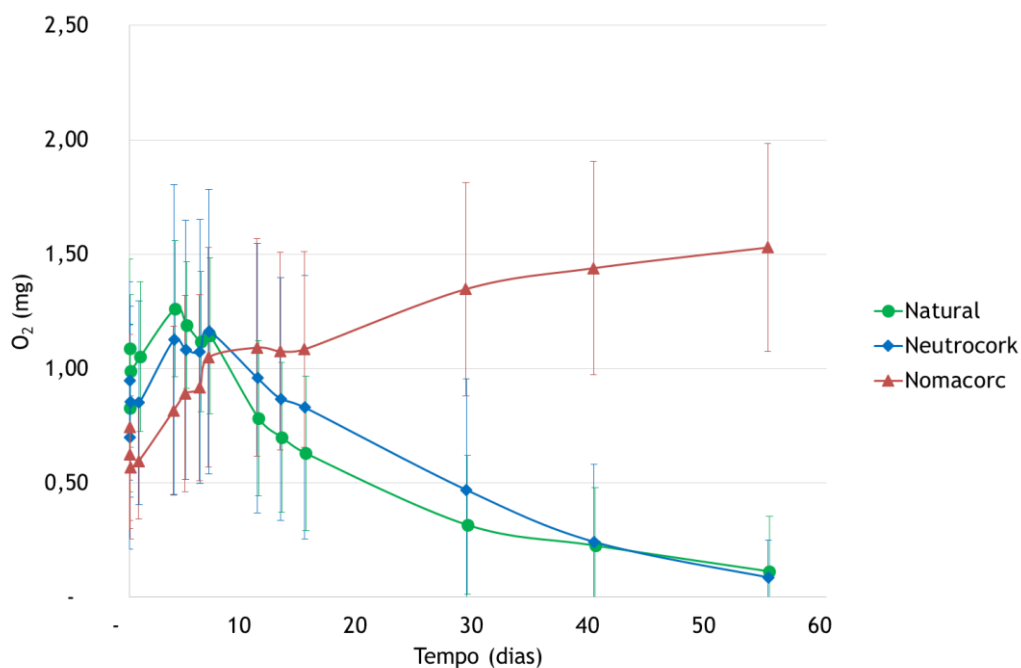


Figura 16 - Cinéticas de transmissão de oxigénio através de diferentes vedantes medidos por quimiluminescência para as garrafas com solução ácida ao longo do tempo de conservação.



Figura 17 - Exemplo de uma garrafa que apresenta estruturas alegadamente microbianas.

4.2.3 Comparação dos ensaios para cada tipo de vedante

Depois de apresentados individualmente cada um dos ensaios, é importante, com vista ao objetivo deste projeto, comparar a transmissão de oxigénio dos diferentes vedantes obtida nos vários ensaios ao longo de 55 dias de ensaio.

Para as rolhas Naturais, observa-se na Figura 18, diferenças no OT entre o ensaio de colorimetria e o ensaio em garrafas vazias usando o método de quimiluminescência (sensores PreSens). No ensaio realizado em garrafas vazias, a evolução da quantidade de oxigénio é bastante mais rápida chegando mesmo a atingir um valor de 4,5 mg em comparação com os cerca de 3 mg de oxigénio determinados pelo método da colorimetria. A evolução observada usando o método da colorimetria é mais gradual, só havendo no início uma subida acentuada da quantidade de oxigénio, proveniente, como já foi referido anteriormente, do engarrafamento. A diferença entre os dois ensaios para além de estar relacionada com o engarrafamento, também tem como origem o facto de as rolhas naturais apresentarem características muito heterogéneas, sendo cada rolha um vedante único. Este fato justifica a dificuldade na comparação dos resultados obtidos para as rolhas de cortiça natural usando este dois métodos. Para ultrapassar esta dificuldade dever-se-ia aumentar a números de rolhas avaliadas por ensaio.

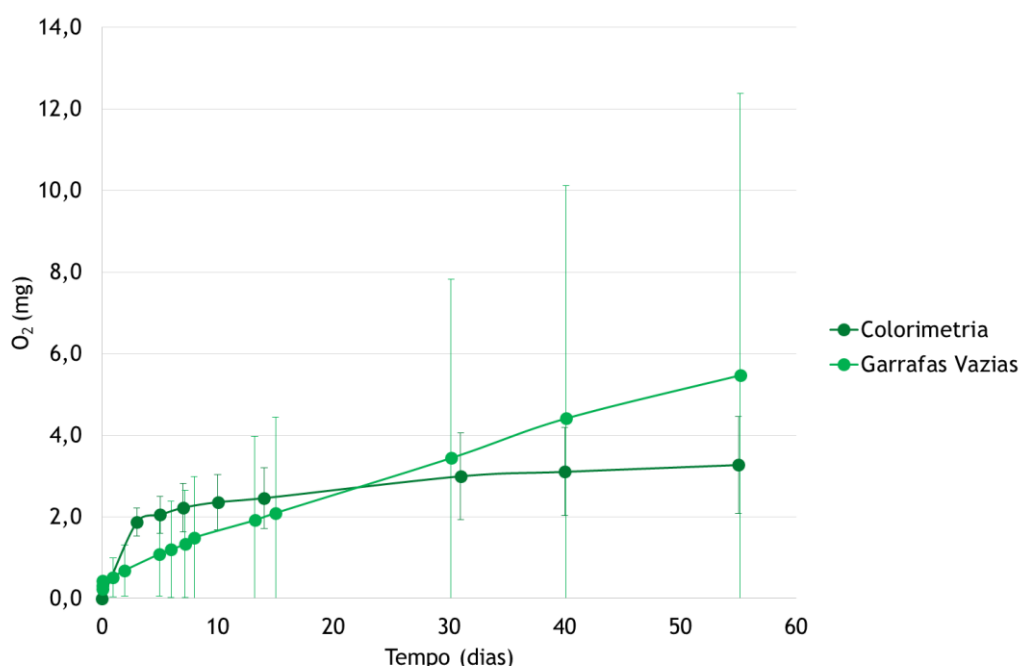


Figura 18 - Comparação do ensaio de colorimetria e de quimiluminescência (garrafas vazias) para a avaliação de transmissão de oxigénio em rolhas de cortiça natural.

Apesar das rolhas Neutrocork® apresentarem uma diferença entre o oxigénio total (OT) presente na garrafa nos dois ensaios, ao longo dos 55 dias, a formas das curvas são bastante

parecidas, como se pode observar na Figura 19. No ensaio avaliado pelo método da colorimetria observa-se uma fase inicial em que o oxigénio evolui mais acentuadamente. A partir do quinto dia, a quantidade de oxigénio na garrafa evolui lentamente nos 2 ensaios, atingindo valores de OT de 2,2 e 0,6 mg no ensaio pelo método da colorimetria e no ensaio em garrafas vazias avaliado pelo método de quimiluminescência, respetivamente. Essa semelhança entre os 2 métodos é mais evidente quando se comparam os dois ensaios a nível de taxas de transmissão de oxigénio. Na Tabela 6 apresenta-se as diferentes taxas de transmissão de oxigénio (TTO) ao longo do tempo de análise e observa-se que os dois métodos se situam no mesmo grupo estatístico. Apenas se observa uma maior diferença na taxas de transmissão de oxigénio calculadas entre os primeiros dias de ensaio (0 a 5 dias) (Tabela 6).

Ao analisar-se os resultados para os mesmos ensaios mas usando as rolhas Nomacorc® (Figura 20), observa-se que os 2 diferentes métodos apresentam uma maior diferença nos primeiros dias de análise pois no ensaio pelo método da colorimetria o aumento da quantidade de oxigénio é mais acentuado. Ao final dos 55 dias de análise os valores de OT obtidos pelo método da colorimetria foram de 2,2 mg enquanto que ensaio em garrafas vazias avaliados pelo método de quimiluminescência atingiram 0,6 mg. Em termos de taxas de transmissão de oxigénio, os 2 métodos enquadram-se num grupo estatístico idêntico. As rolhas Nomacorc® apresentam, como em todos os outros métodos, uma variação nos valores TTO, obtidos por cada método entre o dia 0 ao 5º dia (fase inicial das curvas) (Tabela 6).

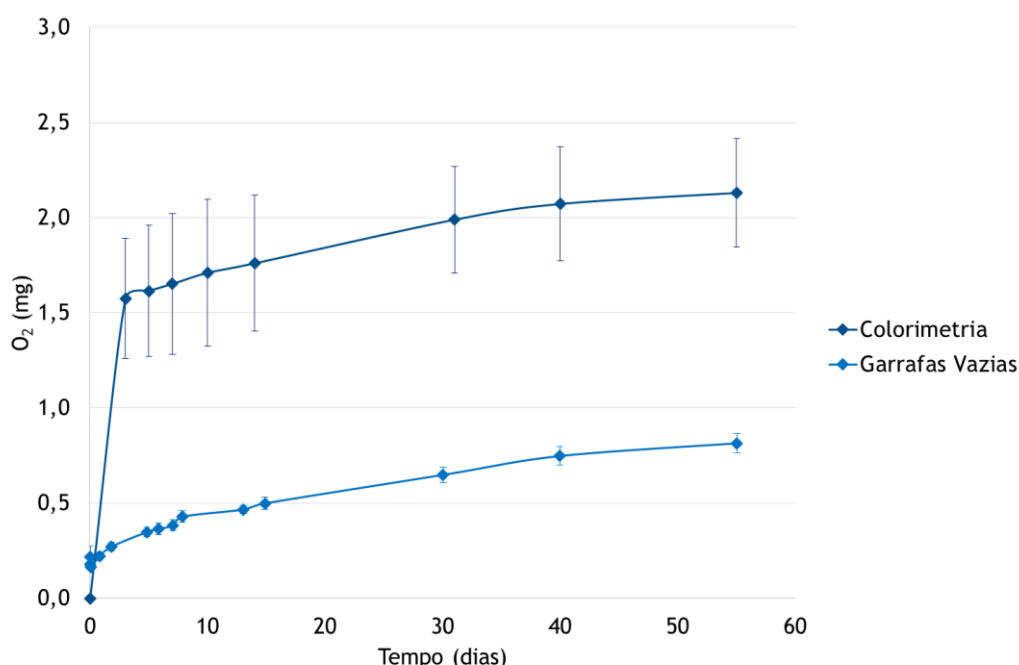


Figura 19 - Comparação do ensaio de colorimetria e de quimiluminescência (garrafas vazias) para a avaliação de transmissão de oxigénio para as rolhas Neutrocork®.

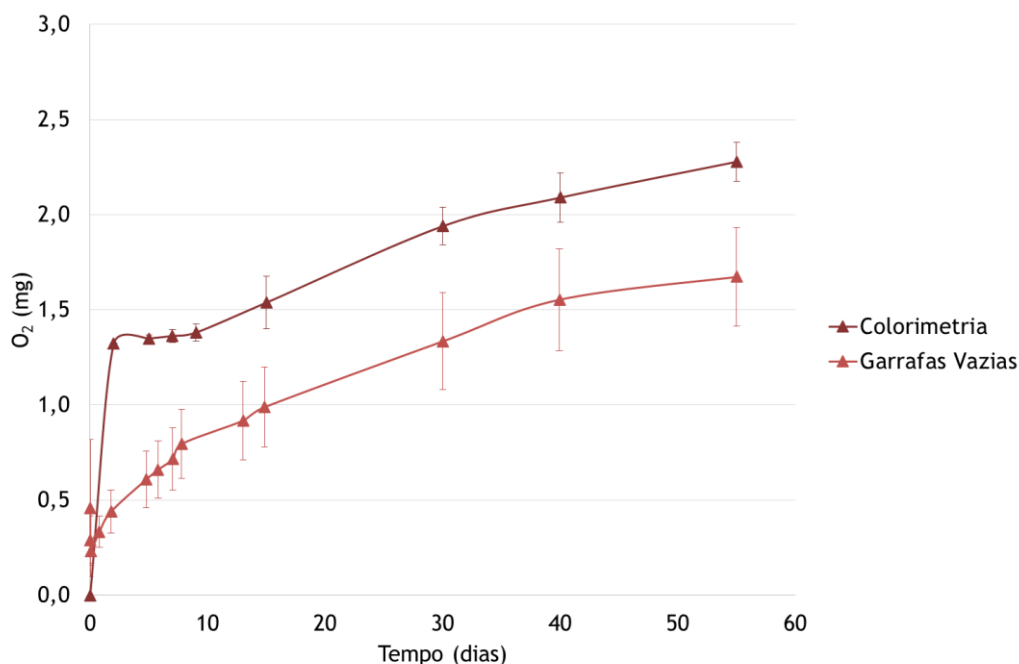


Figura 20 - Comparação do ensaio de colorimetria e de quimiluminescência (garrafas vazias) para a avaliação de transmissão de oxigénio para as rolhas Nomacorc®.

Na Tabela 6 são apresentados os valores obtidos de TTO para diferentes intervalos de tempo. Os valores dos ensaios apresentam estatisticamente, na sua maioria, um valor de p é inferior a 0,05, o que torna as diferenças entre os métodos significativas ($p < 0,05$). Apenas no intervalo de tempo entre o 5º e o 30º dia para os vedantes Nomacorc®, as diferenças não são significativas ($p > 0,05$), observando-se a inclusão dos três métodos no mesmo grupo de amostras.

Quando comparados estatisticamente os valores médios da TTO nos diferentes ensaios para o intervalo de tempo entre 0 e 5 dias e para o mesmo tipo de vedante, observa-se que o ensaio do método da colorimetria é estatisticamente diferente dos outros dois ensaios que usam o método de quimiluminescência (pertence a grupos estatísticos diferentes). Esta diferença acontece devido ao acentuado aumento verificado no ensaio com o método da colorimetria neste intervalo de tempo enquanto que nos métodos da quimiluminescência esta transmissão de oxigénio é significativamente menor.

Nos restantes intervalos de tempo para os diferentes tipos de vedante, os valores de transmissão de oxigénio obtidos pelo método da colorimetria e aqueles obtidos pelo método de quimiluminescência em garrafas vazias pertencem ao mesmo grupo estatístico (grupo A). Esta situação não se observa nos ensaios em garrafas com solução ácida avaliados pelo método de quimiluminescência cujos valores são estatisticamente diferentes daqueles obtidos com os restantes métodos independentemente do vedante considerado. Conclui-se que este

último ensaio, nas condições utilizadas, não pode ser utilizado para medir a transmissão de oxigénio dos diferentes vedantes.

Tabela 6 - Valores médias de taxas de transmissão de oxigénio para os diferentes ensaios segundo diferentes intervalos de tempo.

Vedantes	Intervalo de Tempo (dias)	Taxas de transmissão de oxigénio (mg/L/dia)			Resultado estatístico (p)
		M. Colorimetria	M. Quimiluminescência		
			Garrafas Vazias	Garrafas ácidas	
Natural	0 - 5	0,410 (0,09) ^A	0,135 (0,21) ^B	0,074 (0,08) ^B	0,0001
	5 - 30	0,0036 (0,03) ^{A,B}	0,093 (0,14) ^A	-0,036 (0,01) ^B	0,005
	30 - 55	0,012 (0,01) ^B	0,081 (0,10) ^A	-0,008 (0,01) ^B	0,006
	5 -55	0,024 (0,02) ^{A,B}	0,087 (0,12) ^A	-0,021 (0,01) ^B	0,006
Neutrocork®	0 - 5	0,333 (0,06) ^A	0,078 (0,01) ^B	0,026 (0,05) ^B	0,0001
	5 - 30	0,012 (0,003) ^A	0,012 (0,00098) ^A	-0,025 (0,0042) ^B	0,0001
	30 - 55	0,009 (0,01) ^A	0,007 (0,00076) ^A	-0,015 (0,01) ^B	0,002
	5 -55	0,013 (0,01) ^A	0,009 (0,00057) ^A	-0,020 (0,01) ^B	0,0001
Namacorc®	0 - 5	0,270 (0,004) ^A	0,054 (0,076) ^B	0,031 (0,051) ^B	0,0001
	5 - 30	0,024 (0,003) ^A	0,026 (0,027) ^A	0,019 (0,002) ^A	0,755
	30 - 55	0,014 (0,002) ^A	0,014 (0,0017) ^A	0,007 (0,001) ^B	0,0001
	5 -55	0,019 (0,002) ^A	0,021 (0,002) ^A	0,013 (0,001) ^B	0,0001

Os valores apresentados entre parênteses representam o desvio-padrão das diferentes taxas de transmissão de oxigénio. As letras, em cada linha, em expoente (A e B), representam os grupos estatisticamente idênticos.

4.2.4 Modelos Matemáticos

Os modelos matemáticos foram desenvolvidos usando o software XLSTAT 2013. Com base nos dados retirados de cada um dos ensaios foi desenvolvido, para cada tipo de rolha, um modelo capaz de estimar a transmissão de oxigénio após os 55 dias de análise. Através do software utilizado, pôde-se estudar o ajustamento de vários modelos aos dados obtidos durante os 55 dias do ensaio, sendo modelo representado pela seguinte equação aquele se melhor ajustou:

$$y = PR_1 + \frac{PR_4 - PR_1}{1 + \frac{x^{PR_2}}{PR_3}}$$

Equação 1

Para o desenvolvimento destes modelos, foram usados todos os pontos até ao 30º dia de análise para alguns dos ensaios, excluindo os pontos do 40º dia e do 55º dia para se poder averiguar se o modelo se adequava aos pontos experimentais. Após todos os modelos realizados observou-se que havia modelos em que o ajustamento poderia ser melhorado com a inclusão de mais um ponto de medição (quadragesimo dia). Assim, refizeram-se as modelizações mas agora com todos os pontos até ao 40º dia, o que melhorou significativamente o ajustamento dos dados experimentais. Estes modelos foram aceites segundo dois critérios: a proximidade dos dados experimentais obtidos após quinquagésimo quinto dia com a curva resultante do modelo e o valor do coeficiente de correlação (R^2).

Os modelos desenvolvidos para as rolhas naturais avaliadas pelo método da colorimetria e pelo método de quimiluminescência aplicado em garrafas vazias apresentam diferentes previsões ao longo do tempo (Figura 21). Para o ensaio da colorimetria, os pontos experimentais ajustam-se perfeitamente ao modelo obtido. Este modelo estima que após 12 meses, as rolhas de cortiça natural permitam uma transmissão de aproximadamente 4 mg de oxigénio. No caso do modelo desenvolvido a partir dos valores do ensaio em garrafas vazias, observa-se que os valores estimados após 12 meses são significativamente maiores que aqueles obtidos pelo modelo de colorimetria; contudo, é preciso ter em consideração que estes modelos foram realizados a partir de rolhas de cortiça natural diferentes. Este facto condicionou o modelo do ensaio das garrafas vazias que foi construído com dados onde havia duas rolhas com taxas de transmissão de oxigénio muito mais elevadas que as restantes do grupo. Criou-se 2 modelos de forma a observar a influência das 2 rolhas de cortiça natural que têm uma taxa de transmissão de oxigénio bastante elevada em relação à amostragem. Conclui-se que retirando estas 2 amostras, a previsão de transmissão de oxigénio, após 12 meses, é de aproximadamente 22,5 mg para o caso de usar as 10 rolhas, e de 12,5 mg para o caso de usar apenas 8 rolhas no ensaio.

Para o caso das rolhas Neutrocork®, observa-se que os modelos desenvolvidos para estas rolhas técnicas são diferentes entre si (Figura 22). Para o ensaio da colorimetria, o modelo desenvolvido inicia com um aumento acentuado na quantidade de oxigénio, e progressivamente vai tendendo para a estabilização. Nos ensaios em garrafas vazias avaliado por quimiluminescência, o modelo matemático mostra um aumento mais progressivo. Após 12 meses, a previsão será que as garrafas vedadas com rolha Neutrocork® no ensaio da colorimetria tenham aproximadamente 2,5 mg de oxigénio, enquanto no ensaio em garrafas vazias a quantidade transferida de oxigénio é cerca de 1,5 mg. No entanto verifica-se que esta diferença entre modelos está associado ao período inicial de conservação e em particular com o engarrafamento, o modelo de colorimetria inclui o oxigénio que foi introduzido nesta

operação, enquanto no modelo em garrafas vazias esse efeito foi eliminado com a aplicação do vácuo.

Avaliando o comportamento das rolhas Nomacorc® nos dois diferentes ensaios validados (Figura 23), os dois modelos matemáticos desenvolvidos apresentam uma forma semelhante, apesar da diferença na fase inicial e do valor após um ano. Esta discrepância pode estar associada ao engarrafamento o que provocou uma maior entrada de oxigênio no ensaio da colorimetria e menor para o ensaio usando o método da quimiluminescência.

A partir da análise de todos os modelos criados para os diferentes vedantes é possível concluir que todos se adaptam corretamente aos pontos experimentais obtidos até ao momento. Apesar de bom ajustamento, é ainda prematuro tirar conclusões finais sobre a eficiência destes modelos pois o tempo de medição experimental foi bastante curto, apenas 60 dias para 365 dias de previsão. O acompanhamento da atividade experimental deve ser continuado de forma a comprovar os resultados até agora obtidos.

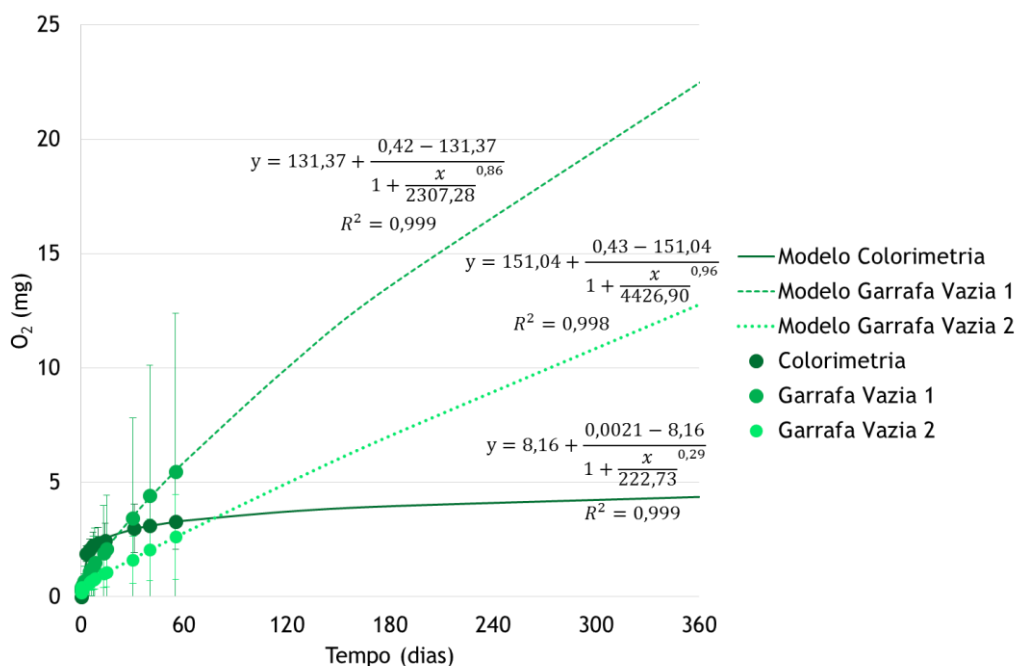


Figura 21 - Modelos matemáticos preditivos das cinéticas de transmissão de oxigênio do ensaio de colorimetria e de quimiluminescência (garrafas vazias) para rolhas de cortiça natural.

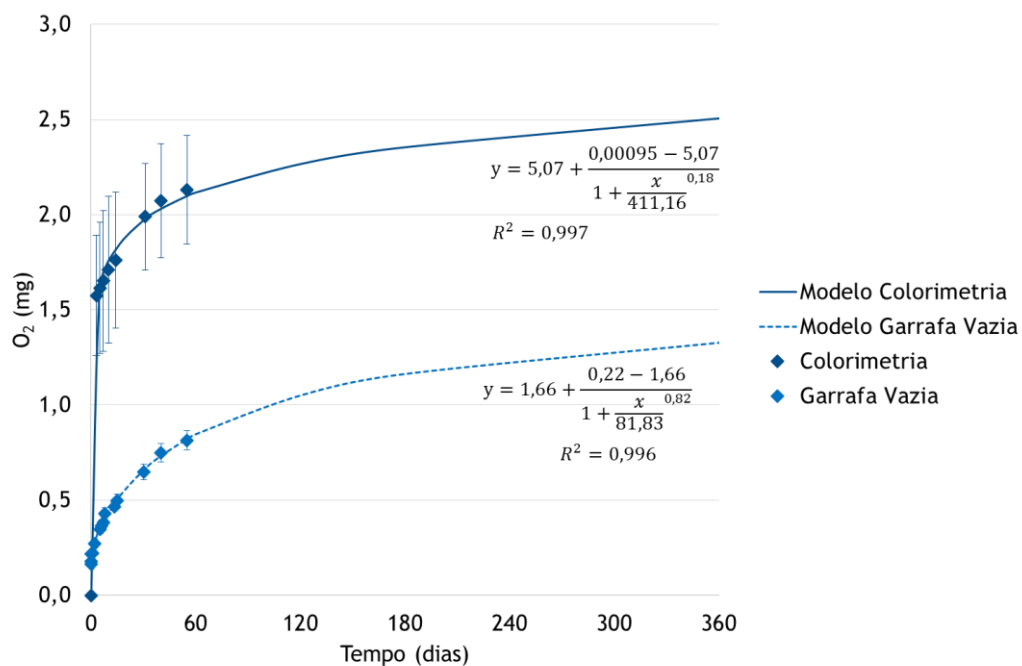


Figura 22 - Modelos matemáticos preditivos das cinéticas de transmissão de oxigénio do ensaio de colorimetria e de quimiluminescência (garrafas vazias) para rolhas Neutrocork®.

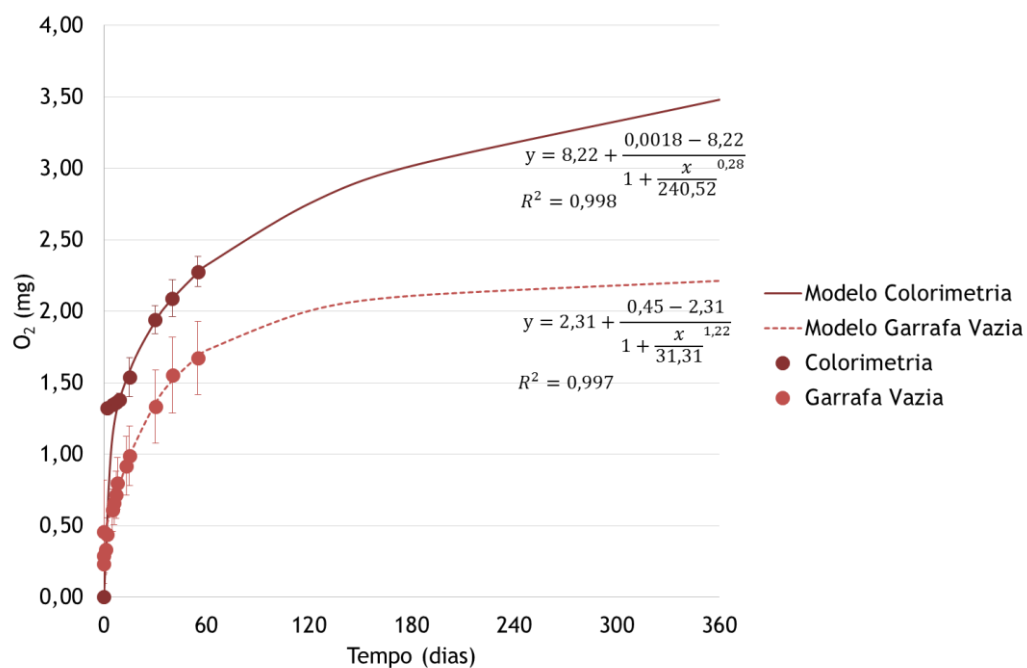


Figura 23 - Modelos matemáticos preditivos das cinéticas de transmissão de oxigénio do ensaio de colorimetria e de quimiluminescência (garrafas vazias) para as rolhas Nomacorc®.

4.3 Aplicação da técnica de quimiluminescência a um ensaio de engarrafamento de vinho

Ao longo deste capítulo pretende-se apresentar os resultados da aplicação do método de quimiluminescência na taxa de transmissão de oxigénio para o interior de garrafas. Os resultados dos ensaios físico-mecânicos e das análises químicas correspondem ao primeiro mês de análise, enquanto a cinética de evolução do oxigénio em garrafa foi realizada durante aproximadamente 70 dias.

A composição físico-química inicial do vinho branco está descrita no Tabela 7, efetuada no Laboratório da Comissão de Viticultura dos Vinhos Verdes. Esta composição pode ser considerada normal para um vinho branco, embora o vinho pudesse ter uma maior quantidade de SO₂, estando mais protegido, sobretudo pelos resultados de oxigénio apresentados abaixo.

Tabela 7 - Composição química do vinho utilizado no ensaio de engarrafamento

Parâmetros	Valores ¹
Título alcoolométrico volúmico TAV (% v/v)	12,3
pH	3,33
Extrato seco total (g/L)	21,1
Extrato não redutor (g/L)	18,6
Massa volúmica (g/mL)	0,9902
Açúcares redutores (g/L)	2,6
Acidez total (g/L)	5,2
Acidez volátil (g/L)	0,2
SO ₂ livre (mg/L)	41
SO ₂ total (mg/L)	95

¹ Valores referentes a três garrafas

4.3.1 Evolução do oxigénio no vinho

Ao longo de 70 dias, fez-se a monitorização da evolução do oxigénio no vinho das 4 garrafas com sensores PSt6 usadas no engarrafamento (Figura 24). Pelos resultados do nível de oxigénio no momento de engarrafamento, 7,6 mg/L (5 mg/L dissolvido + 2,6 mg/L no OHS), verificou-se que esta quantidade de oxigénio poderá ser considerada bastante importante e logo que seja totalmente consumida (o que ainda não aconteceu totalmente após 70 dias), irá conduzir a uma redução de cerca de 30 mg/L de SO₂, o que quer dizer que

cerca de 70% do SO₂ presente no engarrafamento irá ser consumido pelo oxigénio introduzido nesta operação. A Equação 2 representa a previsão feita para a perda de SO₂, assumindo que para um vinho branco, 1 mmole de O₂ (32 mg) é consumida por 2 mmoles de SO₂ (128 mg).

$$Perda\ de\ SO_2\ \left(\frac{mg}{L}\right) = \frac{OT_{consumido} \times V_{garrafa} \times 128}{32} \times \frac{1}{V_{garrafa}}$$

Equação 2

Verificou-se que o oxigénio estava distribuído de maneira diferente ao longo do tempo de conservação (Figura 24). Na altura do engarrafamento a concentração de oxigénio dissolvido era aproximadamente o dobro da concentração presente no *headspace*. Observa-se que o oxigénio foi sendo consumido pelo vinho e que em termos percentuais as concentrações no OHS tenderam a tornar-se mais significativas (Figura 25).

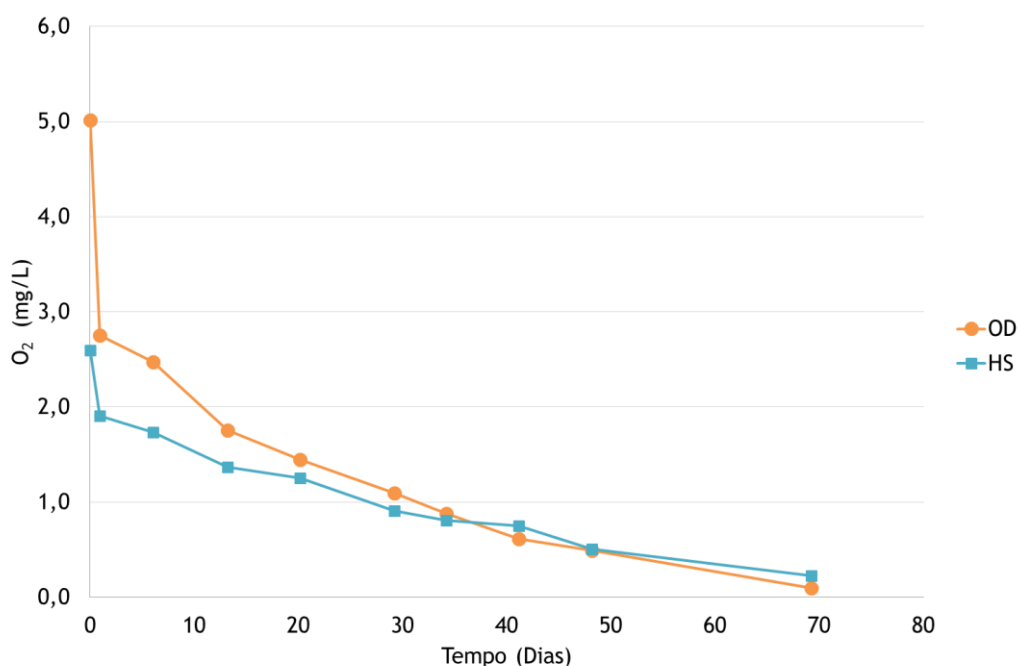


Figura 24 - Evolução da concentração de oxigénio dissolvido e no *headspace* no vinho branco HMR durante 70 dias de conservação.

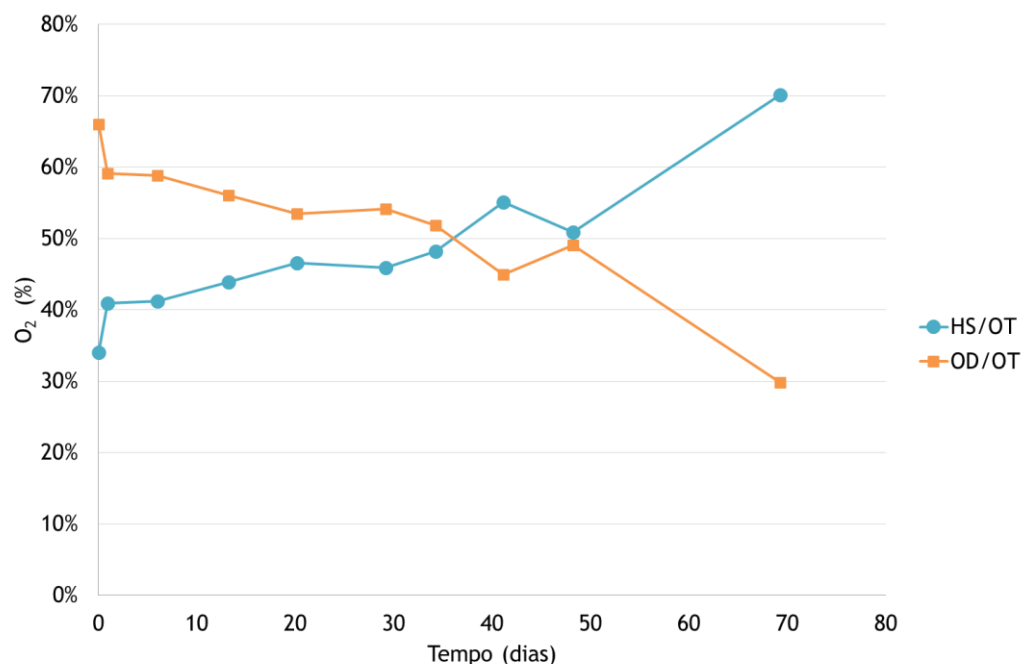


Figura 25 - Valores percentuais médios de oxigénio no *headspace* (OHS) e dissolvido (OD) no vinho branco HMR durante 70 dias de conservação.

4.3.2 Análises químicas ao vinho

Além da composição química do vinho efetuada após três dias do engarrafamento, foram analisados os teores de SO₂ livre e SO₂ total e cor ao fim de 30 dias de conservação usando quatro garrafas de cada tipo de revestimento. Os valores de SO₂ livre apresentaram uma redução de cerca de 9 a 11 mg/L nos vinhos vedados com as diferentes rolhas (Figura 26). Esta redução foi ligeiramente inferior aos 20 mg/L, perda estimada pelos ensaios de quimiluminescência a partir das medições do oxigénio dissolvido que foi consumido durante o primeiro mês. As diferenças de SO₂ livre e total e cor (leitura de absorvância a 420 nm), após o primeiro mês de conservação, não foram estatisticamente significativas nos vinhos vedados com as diferentes rolhas (Figura 26, Figura 27 e Figura 28). Estes resultados mostram que o revestimento das rolhas não tem qualquer tipo de impacto na evolução do vinho num curto espaço de tempo.

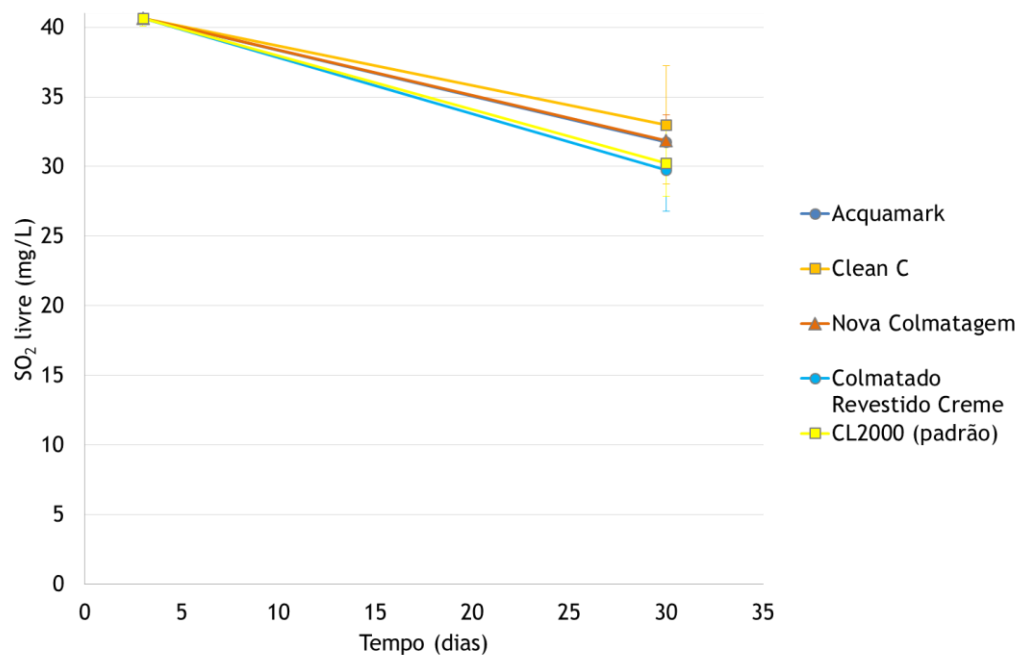


Figura 26 - Evolução da concentração do SO_2 livre de um vinho branco HMR após um mês do engarrafamento usando diferentes revestimentos.

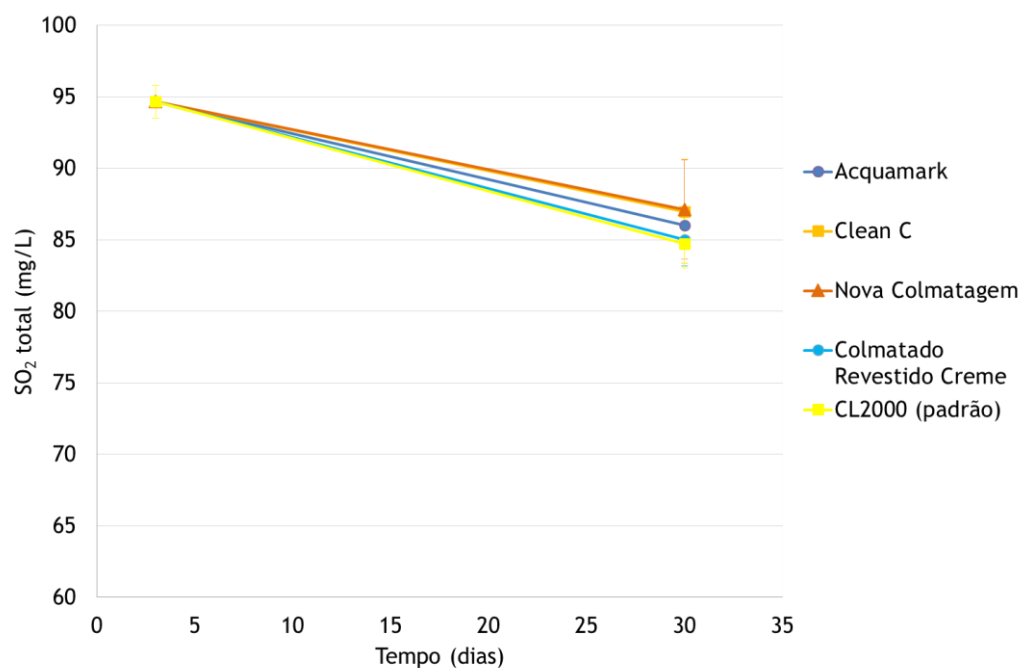


Figura 27 - Evolução da concentração do SO_2 total de um vinho branco HMR após um mês do engarrafamento usando diferentes revestimentos

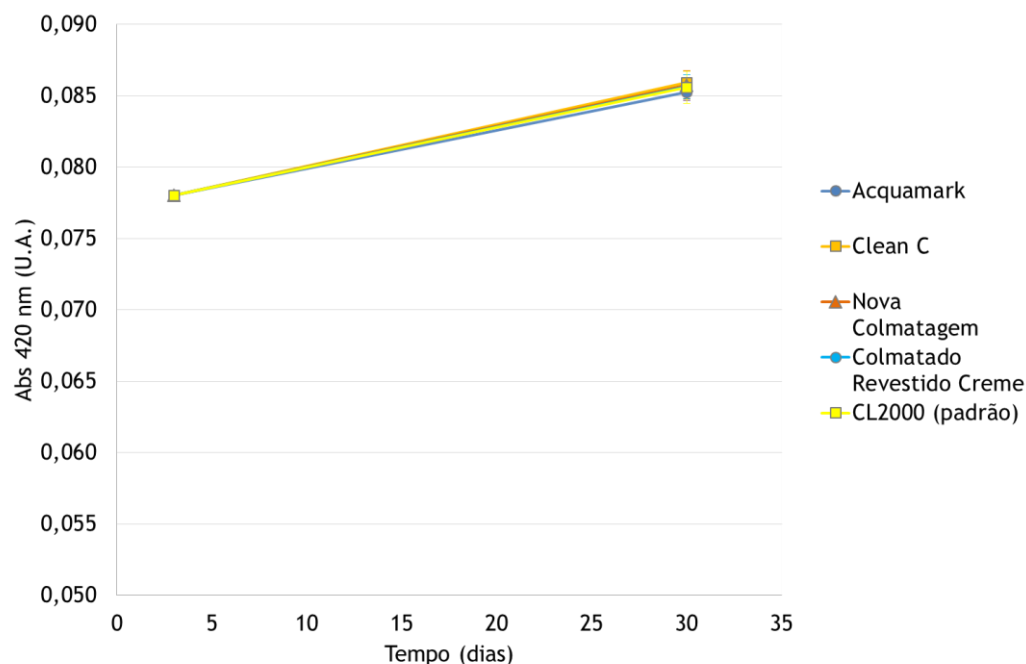


Figura 28 - Evolução da cor (Abs 420 nm) de um vinho branco HMR após um mês do engarrafamento usando diferentes revestimentos.

4.3.3 Análises físico-mecânicos - ensaios de forças de extração e absorção das rolhas

As forças de extração das rolhas ao fim do primeiro mês de conservação mostraram que as rolhas naturais de cortiça com revestimento Nova colmatagem apresentavam valores significativamente superiores às restantes rolhas com os diferentes revestimentos (Figura 29). Relativamente à absorção de vinho pela rolha, não foi detetada qualquer diferença significativa entre as diferentes rolhas de cortiça (Figura 30).

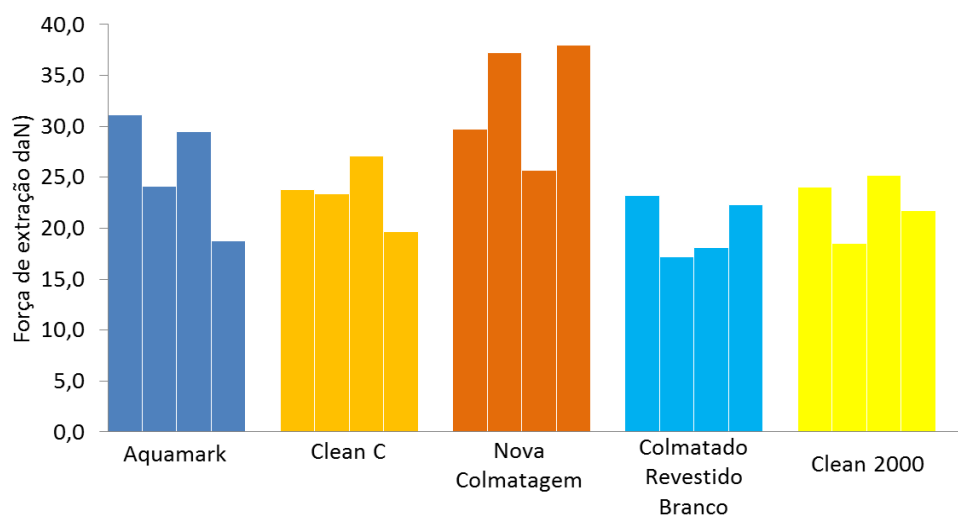


Figura 29 - Forças de extração das rolhas de cortiça natural com diferentes revestimentos após um mês do engarrafamento.

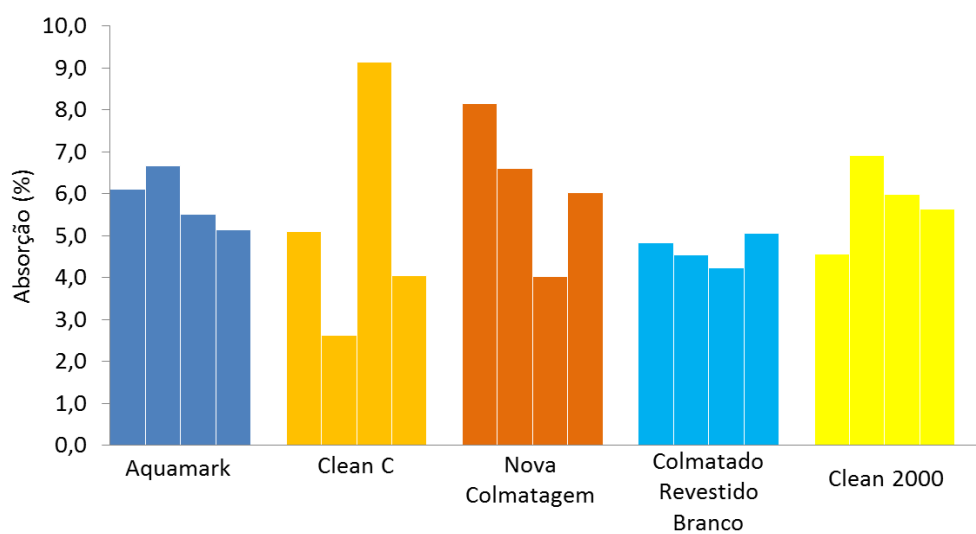


Figura 30 - Percentagem de absorção das rolhas após um mês do engarrafamento.

Em conclusão, ao fim do primeiro mês de conservação, não se observaram diferenças significativas de evolução do vinho vedado entre as rolhas de cortiça natural com diferentes revestimentos.

5 Conclusões

Através da comparação dos métodos de estudo de transmissão de oxigénio, observou-se que o ensaio da colorimetria e o ensaio em garrafas vazias usando o método da quimiluminescência apresentam resultados estatisticamente idênticos após o quinto dia de ensaio. A principal diferença existente entre estes dois métodos está no facto de o método de colorimetria incluir a entrada de oxigénio no momento de engarrafamento, enquanto o método das garrafas vazias mede essencialmente o oxigénio que entra através ou partir dos diferentes vedantes. O ensaio das garrafas com solução ácida não pode ser utilizado para a medição da transmissão de oxigénio das diferentes rolhas pois existe um consumo de oxigénio pelos microrganismos presentes no interior da garrafa.

A partir dos resultados obtidos foi possível criar modelos matemáticos preditivos da transmissão de oxigénio através dos diferentes vedantes; contudo, ainda é prematuro tirar conclusões definitivas sobre a eficiência destes modelos pois o tempo de medição experimental apenas foi realizado durante 55 dias e foram efetuados poucos ensaios.

O método de quimiluminescência parece ser uma ferramenta bastante útil para avaliar de forma não destrutiva do vinho a quantidade de oxigénio introduzida na operação de engarrafamento de vinhos. Através deste método conseguiu-se estimar com precisão a quantidade de oxigénio presente no engarrafamento e verificar o seu impacto nos parâmetros físico-químicos do vinho e em particular no SO_2 . No ensaio, onde este método foi utilizado, não foi possível durante o primeiro mês observar diferenças significativas de evolução dos vinhos vedados com as rolhas de cortiça natural com diferentes revestimentos.

6 Avaliação do Trabalho Realizado

6.1 Objetivos Realizados

Este projeto teve como principais objetivos a comparação de métodos de estudo da transmissão de oxigénio ao vinho em função de diferentes tipos de vedantes e a aplicação de um dos métodos no estudo da entrada de oxigénio na garrafa aquando do engarrafamento.

Ao longo deste projeto fez-se a comparação dos dois métodos usados para análise da transmissão de oxigénio através de diferentes vedantes. Observou-se que para o método das garrafas com solução ácida, não foi possível obter resultados credíveis e fiáveis, pois houve contaminação dos ensaios, o que fez com que acontecesse um consumo de oxigénio no interior da garrafa. Criou-se, através dos pontos experimentais obtidos ao longo de 40 dias, modelos matemáticos preditivos da transmissão de oxigénio através dos diferentes vedantes, sem que para isso fosse necessário haver um estudo prolongado.

A aplicação da tecnologia de quimiluminescência ao engarrafamento de um vinho em cave foi efetuada com sucesso, sendo possível estimar com precisão a evolução de alguns compostos químicos do vinho.

Após todo o trabalho realizado, conseguiu-se completar os objetivos deste trabalho, tendo-se neste momento uma melhor perceção dos dois métodos abordados.

6.2 Outros Trabalhos

Ao longo do projeto de 5 meses, para além do trabalho apresentado anteriormente também foi possível acompanhar alguns dos trabalhos em que o departamento I&D estava envolvido.

Um dos trabalhos, que o autor desta dissertação, acompanhou e cooperou durante o tempo do estágio foi o trabalho de rotina do laboratório no controlo de TCA cuja análise está centralizada no departamento I&D da A&I. Todos os dias, o laboratório recebe aproximadamente 600 amostras das oito unidades fabris da A&I. O trabalho inclui todas as tarefas de preparação e análise de TCA desde a lavagem e identificação dos frascos, preparação das amostras até à análise cromatográfica (SPME-GC-ECD/MS) de TCA propriamente dita.

Para além deste estudo de transmissão de oxigénio de diferentes vedantes de vinho, houve a cooperação do autor em todos os trabalhos sobre este tema, como por exemplo

trabalhos semelhantes ao realizado em que era feito o estudo de um determinado vedante utilizando o método da colorimetria ou da quimiluminescência. Também participou ativamente na preparação e execução de outros estudos de engarrafamento como por exemplo aquele realizado em colaboração com Adega Cooperativa de Borba que visa a compreensão da evolução de um vinho em garrafa e em *bag-in-box*.

6.3 Limitações e Trabalho Futuro

Seria necessário prosseguir os trabalhos para melhor se perceber se os modelos desenvolvidos estão de acordo com a real cinética de transmissão de oxigénio dos diferentes vedantes. Assim conseguir-se-á avaliar se os próximos pontos experimentais estarão de acordo com a previsão feita pelos modelos matemáticos desenvolvidos.

Ao longo deste tempo as dificuldades e limitações foram aparecendo. Um dos fatores mais importantes para o desenrolar de um bom projeto é o tempo disponível para a sua realização e que muitas vezes se torna limitante para o trabalho. Para este tipo de análise é importante ter em conta vários meses e seria interessante ver se os modelos representam verdadeiramente a realidade. Outro fator limitante foi o preço elevado de cada sensor para o método da quimiluminescência o que obrigou a uma redução do número de amostras por ensaio. Para trabalho futuro era importante certificar-se sempre que as rolhas, principalmente de cortiça, estão isentas de microrganismos ou que estes não se desenvolvem, de modo a evitar o que aconteceu com as rolhas no ensaio das garrafas com solução ácida. Outro fator importante a ter atenção será o processo de engarrafamento pois ficou claro que este tem uma grande influência nos resultados finais.

7 Referências

- Amorim & Irmãos, S. A. (2012). *Manual de acolhimento*. Amorim & Irmãos, S. A.
- Amorim. Catálogo Rolhas. (Online). [acedido a 09 de Junho de 2013]
<http://www.amorimcork.com/pt/products/catalogue/>
- APCOR. 2010. Cortiça, Cultura, Natureza, Futuro. (Online). [acedido a 30 de abril de 2013] <http://www.apcor.pt/userfiles/File/Qualidade.pdf>
- APCOR. 2012. Anuário APCOR 2012 (Online). [acedido a 26 de maio de 2013]
<http://apcor.pt/userfiles/File/Publicacoes/AnuarioAPCOR2012.pdf>
- APCOR. Propriedades da cortiça. (Online). [acedido a 29 de Abril de 2013]
<http://apcor.pt/artigo/propriedades-cortica.htm>
- APCOR. Rolhas aglomeradas. (Online). [acedido a 29 de Abril de 2013]
<http://apcor.pt/artigo/248.htm>
- APCOR. Rolhas capsuladas. (Online). [acedido a 29 de Abril de 2013]
<http://apcor.pt/artigo/249.htm>
- APCOR. Rolhas de champanhe. (Online). [acedido a 29 de Abril de 2013]
<http://apcor.pt/artigo/246.htm>
- APCOR. Rolhas naturais colmatadas. (Online). [acedido a 29 de Abril de 2013]
<http://apcor.pt/artigo/245.htm>
- APCOR. Rolhas naturais. (Online). [acedido a 29 de Abril de 2013]
<http://apcor.pt/artigo/242.htm>
- APCOR. Rolhas técnicas. (Online). [acedido a 29 de Abril de 2013]
<http://apcor.pt/artigo/247.htm>
- Brotto, L., Battistutta, F., Tat, L., Comuzzo, P., & Zironi, R. Modified nondestructive colorimetric method to evaluate the variability of oxygen diffusion rate through wine bottle closures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3567-3572, 2010.
- Corticeira Amorim SPGS, S.A. 2012. Relatório de Contas. (Online). [acedido a 29 Abril de 2013]
http://amorim.com/xms/files/CorticeiraAmorim/Relatorio_e_Contas/Corticeira_Amorim_-_R_C_2012.pdf

- Déval, J.-B., Vidal, S., & Aagaard, O. Measurement of the oxygen transmission rate of co-extruded wine bottle using a luminescence-based technique. *Packaging Technology and Science*, 1-18. 2011.
- Dias, M.M. Pore Scale Hydrodynamics. In *Adsorption: Science and Technology*, A.E. Rodrigues (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, 1989.
- Fortes, M., Rosa, M., & Pereira, H. *A cortiça*, IST Press, Lisboa, 2004
- Huber, C., Nguyen, T.-A., Krause, C., Humele, H., & Stangelmayer, A. Oxygen ingress measurement into PET bottles using Optical-chemical sensor technology. *Monatsschrift fur Brauwissenschaft*, 5-15. 2006.
- Karbowiak, T., Gougeon, R., Alinc, J.-B., Brachais, L., Debeaufort, F., Villey, A., & Chassagne, D. Wine Oxidation and the role of cork. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 20-52. 2010.
- Lopes, P., Saucier, C., & Glories, Y. Nondestructive colorimetric method to determine the oxygen diffusion rate through closures used in winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6967-6973, 2005.
- Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P.-L., & Glories, Y. Impact of storage position on oxygen ingress through different closures into wine bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6741-6746. 2006.
- Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P.-L., & Glories, Y. Main routes of oxygen ingress through different closures into wine bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5167-5170, 2007.
- Lopes, P., Silva, M., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne, V., Saucier, C., Subourdiu, D. *Impact of oxygen dissolved at bottling and transmitted through closures on the composition and sensory proprieties of sauvignon blanc wine durnig bottle storage*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10261-10270, 2009.
- OxySense. Homepage. (Online). [acedido a 29 de Abril de 2013] <http://www.oxysense.com/>
- Poças, M. F., Ferreira, B., Pereira, J., & Hogg, T. *Measurement of oxygen transmission rate though foamed materials for bottle closures*. (Online) [acedido a 14 de outubro de 2010] <http://www.interscience.wiley.com>
- PreSens. Home. (Online). [acedido a 29 de Abril de 2013] <http://www.presens.com/>

- Silva, M., & Teissedre, P.-L., *Closures effects and consequences on wine ageing and conservation*, Bordeaux: Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université Bordeaux Segalen, 2011.
- Vidal, J.-C., & Chayvialle, C. *Oxygen transmission rate of screwcaps by chemoluminescence and air/capsule/headspace/acidified water system*. Créteil, France: Centre de recherche, 2010.

Anexo 1 Caraterísticas e propriedades dos sensores PSt6

Neste anexo apresenta-se as características e propriedades dos sensores PSt6 usados ao longo do trabalho.

Tabela 8 - Especificações do sensor PSt6 (Huber *et al*, 2006)

	Oxigénio Dissolvido	Oxigénio dissolvido e gasoso
Gama de medição	0 - 1,8 mg/L (ppm) 0-56,9 μmol	0 - 4,2% oxigénio saturado 0 - 41,4 hPa
Limite de deteção	1ppb de oxigénio dissolvido	0,002% Oxigénio
Resolução	$\pm 0,010 \mu\text{mol}$ até $0,03 \mu\text{mol}$ $\pm 0,020 \mu\text{mol}$ até $2,8 \mu\text{mol}$	$\pm 0,0007 \%$ até $0,002 \%$ O_2 $\pm 0,0015 \%$ até $0,2 \%$ O_2 $\pm 0,007 \text{ hPa}$ até $0,023 \text{ hPa}$ $\pm 0,015 \text{ hPa}$ até $2,0 \text{ hPa}$
Precisão (20 °C)	$\pm 1 \text{ ppb}$ ou 3% da concentração respetiva,	
Tempo de resposta	<40 s	<6 s
Gama de Temperatura	0 - 50 °C	

Tabela 9 - Propriedades do sensor PSt6 (Huber *et al*, 2006)

Compatibilidade	Soluções aquosas, etanol, metanol
Não há interferências na sensibilidade com	pH 1 - 14 CO ₂ , H ₂ S, SO ₂ Espécies Iônicas
Há interferências na sensibilidade com	Solventes orgânicos (acetona, tolueno, clorofórmio ou cloreto de metileno) Gás cloro
Procedimentos de esterilização	Esterilização a vapor Óxido de etileno Irradiação gama
Procedimentos de limpeza	Limpeza no local 3% H ₂ O ₂ agentes ácidos (HCl, H ₂ SO ₄) max. 4-5%
Calibração	Dois pontos convencionais de calibração em ambiente livre de oxigênio (azoto) e uma segunda calibração,
Estabilidade no armazenamento	2 anos desde que o sensor seja armazenado no escuro

Anexo 2 Dados para a calibração do equipamento do método da quimiluminescência

Neste anexo são apresentados os dados para a calibração do equipamento de quimiluminescência usado. Os valores a negrito são aqueles que são necessário introduzir segundo a ordem descrita no manual de instruções.

Tabela 10 - Dados para a calibração do equipamento de quimiluminescência para os sensores PSt6 usados

Pressão atmosférica (hPa) 973					
	Sinal de fase (°)	Intervalo válido (°)	Temperatura (°C)	Intervalo válido (°C)	Amplitude (μV)
cal 0 0% ar sat	65,76	63,00 - 68,00	20	18,0 - 22,0	57498
cal 2nd 9,62% ar sat	24,04	22,00 - 28,00	20	18,0 - 22,0	21602

